



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Patologia e clínica de animais exóticos e autóctones

Inês Farias Mateus

Orientador:

Prof. Doutora Joana Margarida Ferreira da Costa Reis

Coorientador:

Mestre Vanessa Soeiro

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Relatório de estágio

Évora 2014

“Este relatório de estágio inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri.”

Patologia e clínica de animais exóticos e autóctones

Inês Farias Mateus

Orientador:

Prof. Doutora Joana Margarida Ferreira da Costa Reis

Coorientador:

Mestre Vanessa Soeiro

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Relatório de estágio

“Este relatório de estágio inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri.”

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha família pelo apoio contínuo e persistente, especialmente à minha mãe pela paciência e incentivo que tornaram possível a conclusão deste relatório.

Em segundo lugar gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Doutora Joana Reis e à minha coorientadora Mestre Vanessa Soeiro pela oportunidade de trabalhar um tema tão enriquecedor, o qual contribuiu para o amadurecimento dos meus conhecimentos, assim como pela competência científica e acompanhamento do trabalho prático, pelas críticas, correções e sugestões relevantes.

Um especial agradecimento à Engenheira Mestre Luísa Fialho pela sua colaboração e dedicação na área de histologia, sem as quais não teria sido possível concretizar este trabalho. Agradeço à Professora Doutora Sandra Branco pela oportunidade, pela disponibilidade manifestada e pela partilha de conhecimentos na área de Patologia e à instituição Universidade de Évora.

A minha gratidão à Dr.^a Sara Loíó e à Dr.^a Vanessa Soeiro pela partilha de conhecimentos e experiências, pelo apoio e boa disposição, pela disponibilidade sempre manifestada e pela amizade, ao longo do meu estágio.

Por fim, agradeço a toda a equipa do centro de recuperação de animais selvagens do Parque Biológico de Gaia pela hospitalidade, pela partilha de experiências e pela oportunidade de testemunhar o trabalho de equipa.

RESUMO

O trabalho apresentado resulta do estágio decorrido de novembro de 2011 a março de 2012 no Parque Biológico de Gaia.

Ao longo dos anos, desde o início do comércio intensivo de tartarugas exóticas observou-se a libertação clandestina de muitos destes animais de estimação. A ausência de estudos sobre o estado sanitário destas tartarugas no nosso país e o impacto que a sua libertação provoca na fauna e flora portuguesas, serviu como motivação para o presente estudo, que incidiu sobre a população de tartarugas exóticas ingressadas no Parque Biológico de Gaia.

Para melhor conhecer o estado sanitário foram realizados necrópsias e exames histopatológicos. Verificou-se que o fígado apresentava alterações em 69% dos cadáveres examinados. Do ponto vista microscópico, o fígado (74%), o rim (74%) e a bexiga (67%) foram os órgãos mais frequentemente alterados. As afeções mais frequentes foram a lipidose hepática (74%), a septicémia (48%) e a doença ulcerativa cutânea septicémica (41%).

Palavras-chave: Tartarugas exóticas; Tartarugas autóctones; Necrópsias; Histopatologia

ABSTRACT

Pathology and clinical of exotic and autochthonous animals

The activity developed in the period from November 2011 to March 2012 at Gaia Biological Park resulted on the present work.

Since the beginning of the trade of exotic turtles, it has been observed the clandestine release of many of these pets. The absence of studies on the health status of these exotic turtles and on the impact of their release on the ecosystems motivated this study. It is focused primarily on necropsies and histopathological examinations of exotic turtles captured from the wild or left in Gaia Biological Park. On necropsy, the liver showed a higher percentage of macroscopic changes (69%). The liver (74%), kidney (74%) and bladder (67%) were the most frequently affected by microscopic changes. In this study the most frequent disorders observed were hepatic lipidosis (74%), septicaemia (48%) and septicemic cutaneous ulcerative disease (41%).

Keywords: Exotic turtles; Native turtles; Necropsies; Histopathology

ÍNDICE

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice	vi
Índice de figuras	vii
Índice de gráficos	viii
Índice de tabelas	ix
Lista de abreviaturas	x
1. Introdução	1
2. Répteis	6
2.1. Quelónios	7
2.2. Anatomia, fisiologia e histologia dos quelónios	7
2.2.1. Termorregulação	7
2.2.2. Sistema músculosquelético	8
2.2.3. Sistema tegumentar	9
2.2.4. Cavidades corporais	10
2.2.5 Sistema respiratório	10
2.2.6. Sistema digestivo	14
2.2.7. Sistema urinário	19
2.2.8. Sistema cardiovascular	24
2.2.9. Sistema linfoide e hematopoiético	26
2.2.10. Sistema reprodutor	27
3. Espécies autóctones	31
4. Espécies exóticas presentes na fauna portuguesa	35
5. Materiais e métodos	42
6. Resultados e discussão	49
7. Conclusão	105
Bibliografia	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Ficha de necrópsia criada e utilizada neste estudo.	46
Figura 2 – Úlceras na carapaça, plastrão e na pele numa tartaruga da Flórida.	55
Figura 3 – Descoloração da carapaça e osso dérmico exposto numa tartaruga da Flórida.	56
Figura 4 – Imagem à esquerda e central - Deformação da carapaça de uma tartaruga da Flórida (<i>Trachemys scripta</i>). Imagem à direita – Deformação do plastrão de uma tartaruga corcunda do Mississípi (<i>Graptemys pseudogeographica</i>).	56
Figura 5 – Abscesso caseoso subcutâneo num cágado mediterrâneo.	58
Figura 6 – Abscesso sólido no interior do plastrão (imagem à esquerda) numa tartaruga da Flórida (<i>Trachemys scripta</i>) e abscesso no membro anterior esquerdo (imagem à direita) numa tartaruga corcunda do Mississípi (<i>Graptemys pseudogeographica</i>).	58
Figura 7 – Abscesso subcutâneo no membro anterior esquerdo da tartaruga corcunda do Mississípi (<i>Graptemys pseudogeographica</i>) representada na figura 6 (imagem à esquerda). Quelónio. H-E. 40x e 100X.	60
Figura 8 – Alterações macroscópicas de intestino observadas durante as necrópsias, associadas a septicémia.	61
Figura 9 – Alterações macroscópicas de coração observadas durante as necrópsias, associadas a septicémia.	61
Figura 10 – Rim. Reação inflamatória aguda. (a) Imagem à esquerda – Infiltração por heterófilos no tecido renal. (b) Imagem à direita – Formação de um granuloma de heterófilos. Quelónio. H-E. 100x.	63
Figura 11 – Fígado. (a) Imagem à esquerda – Granuloma. Quelónio. H-E. 100x (b) Imagem à direita – Infiltração de heterófilos, macrófagos e monócitos. Pigmento de melanina. Quelónio. H-E 400x.	63
Figura 12 – Rim. Nefrite intersticial (i) e glomerular (g). Quelónio. H-E. 100x e 400x.	65
Figura 13 – Fígado. Granuloma. Colónias de bactérias. Quelónio. H-E. 100x.	65
Figura 14 – Coração. Colónias bacterianas. Quelónio. H-E. 40x e 100x.	66
Figura 15 – (a) Imagem à esquerda – Pulmão. Pneumonia bacteriana. Septicémia. Quelónio. H-E. 100x (b) Imagem à direita – Baço. Colónias bacterianas. Septicémia. Quelónio. H-E. 100x.	66
Figura 16 – Coração. Colónias bacterianas. Granuloma heterofílico. Quelónio. H-E. 40x e 100x.	68
Figura 17 – Coração. Granuloma heterofílico. Quelónio. <i>Ziehl-Neelsen</i> . 100x.	68
Figura 18 – Pulmão. Pneumonia bacteriana. Granuloma crónico. Quelónio. H-E. 40x e 100x.	69
Figura 19 – Coração. Quelónio. H-E. 100x.	70
Figura 20 – Baço. Proliferação de células inflamatória. Septicémia. Quelónio. H-E. 40x e 100x.	70
Figura 21 – Baço. Proliferação de células inflamatória. Heterofilia. Septicémia. Quelónio. H-E. 100x e 400x.	71
Figura 22 – Fígado. Centros melanomacrofágicos. Quelónio. H-E. 100x.	71
Figura 23 – Fígado. Melanina hepática. Despigmentação. Quelónio. H-E. 100x.	71
Figura 24 – Rim. (a) Imagem à esquerda – Nefrite intersticial. Pielonefrite. Quelónio. H-E. 100x (b) Imagem à direita – Aglomerado de cocos <i>Gram</i> positivos (assinalados com círculo). Quelónio. <i>Coloração Gram</i> . 1000x.	74

Figura 25 – Pulmão. (a) Imagem à esquerda – Pneumonia bacteriana. Septicémia. Quelônio. H-E. 1000x	
(b) Imagem à direita – Colônia bacteriana cocos <i>Gram</i> positivos (Δ). Quelônio. <i>Gram</i> . 400x.	75
Figura 26 – Alterações macroscópicas de pulmão observadas durante as necrópsias numa tartaruga da Flórida (<i>Trachemys scripta</i>).	77
Figura 27 – Alterações macroscópicas de pulmão numa tartaruga da Flórida (<i>Trachemys scripta</i>). Abscesso de coloração branca (imagem à esquerda) ou castanha (imagem à direita) na porção caudal do pulmão.	77
Figura 28 – Pulmão. Pneumonia micótica. Quelônio (Tartaruga da Flórida - <i>Trachemys scripta</i>). H-E. 100x 400x.	80
Figura 29 – Pulmão. Pneumonia micótica. Quelônio. PAS. 100x 400x.	81
Figura 30 – Pulmão. Pneumonia micótica. Quelônio. <i>Grocott</i> . 100x 400x.	81
Figura 31 – Rim. Trombo arterial (t) – Enfarte. Quelônio. H-E. 40x 100x.	89
Figura 32 – Rim. Necrose glomerular. Quelônio. H-E. 100x.	89
Figura 33 – Rim. Corpos hialinos intracitoplasmáticos. Quelônio. H-E. 100x 400x.	90
Figura 34 – Rim. Cilindro hialino no ducto coletor. Quelônio. H-E. 100x.	90
Figura 35 – Alterações macroscópicas de bexiga observadas durante as necrópsias.	91
Figura 36 – (a) Imagem à esquerda – Bexiga. Cristais. Quelônio. H-E. 400x (b) Imagem centro – Bexiga. Cristais. Quelônio. PAS 400x (c) Imagem à direita – Bexiga. Suspeita da presença de cristais. Quelônio. <i>Grocott</i> . 400x	92
Figura 37 – Alterações macroscópicas de fígado em tartarugas exóticas – Lipidose hepática.	93
Figura 38 – Alterações macroscópicas de fígado em tartarugas exóticas.	93
Figura 39 – Alterações macroscópicas de fígado em tartarugas exóticas. Lipidose hepática (imagem à esquerda). Parasitismo por <i>Ascarididae</i> (imagem à direita).	94
Figura 40 – Fígado. Lipidose hepática. Quelônio. H-E. 40x e 100x.	94
Figura 41 – Alterações macroscópicas de intestino. Impactação intestinal numa tartaruga hieroglífica (<i>Pseudemys concinna</i>) (imagem à esquerda) e acumulação de conteúdo cecal em diferentes tartarugas exóticas (imagem do centro e à direita).	100
Figura 42 – Alterações macroscópicas do sistema reprodutor feminino de dois exemplares de tartarugas da Flórida (<i>Trachemys scripta</i>) – Estase folicular.	102
Figura 43 – Torção uterina e presença de um ovo na cavidade celômica numa tartaruga da Flórida (<i>Trachemys scripta</i>) – Celomite.	104

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Classe de animais assistidos e suas respectivas frequências absolutas (n = 453).	2
Gráfico 2 – Número de necrópsias realizadas no estudo segundo a espécie e sexo (n = 42).	5
Gráfico 3 – Frequência relativa das causas de morte (n = 42).	49
Gráfico 4 – Frequência relativa do tipo de técnica na aplicação de Eutasil® (n = 16).	49
Gráfico 5 – Frequência relativa do tipo de conservação de cadáveres (n = 42).	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela de distribuição de frequências relativas de cada ordem da classe de Aves em percentagem (n = 310).	3
Tabela 2 – Tabela de distribuição de frequências relativas de cada ordem da classe de Mamíferos em percentagem (n = 52).	4
Tabela 3 – Tabela de distribuição de frequências relativas de cada ordem da classe de Répteis em percentagem (n = 89).	4
Tabela 4 – Distribuição de produtos de nitrogénio excretados pelos quelónios em diferentes ambientes.	22
Tabela 5 – Características da história natural de cada espécie do estudo.	37
Tabela 6 – Recolha de amostras e tipo de análise aplicada.	48
Tabela 7 – Processamento de tecidos a partir do programa I automático do aparelho Histoquinette-Jung Histokinette 2000.	48
Tabela 8 – Tabela de distribuição de frequências absolutas de cada amostra de órgão (n = 150).	52
Tabela 9 – Tabela de distribuição de frequências relativas de cada órgão com alteração macroscópica (n = 42).	52
Tabela 10 – Tabela de distribuição de frequências relativas de cada órgão com alteração microscópica (N = 116).	53
Tabela 11 – Diagnósticos presuntivos. Tabela de distribuição de frequências relativas de cada patologia (n = 42).	54

LISTA DE ABREVIATURAS

Alt	Altura
ALDEIA	Associação Ação, Liberdade, Desenvolvimento, Educação, Investigação, Ambiente
ALT	<i>Alanine aminotransferase</i> (Alanina aminotransferase)
AST	<i>Aspartate aminotransferase</i> (Aspartato aminotransferase)
CC	Comprimento da carapaça
CCC	Comprimento curvilíneo da carapaça
CCd	Comprimento da cauda
Ccl	Comprimento cloacal
CE	Comissão europeia
CIBIO	Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos
CP	Comprimento do plastrão
GGT	<i>Gamma-glutamyl transpeptidase</i> (Gama-glutamyl transpeptidase)
H-E	Coloração de hematoxilina e eosina
ICNF	Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas
LC	Largura da carapaça
LCab	Largura da cabeça
LCC	Largura curvilínea da carapaça
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i> (Lactato desidrogenase)
LP	Largura do plastrão
PAS	<i>Periodic acid Schiff</i> (Ácido periódico – Reagente de <i>Schiff</i>)
PBG	Parque Biológico de Gaia
pH	Potencial hidrogeniónico
PTH	<i>Parathyroid hormone</i> (Hormona da paratiroide)
RIAS	Centro de Recuperação e Investigação de Animais Selvagens
SCUD	<i>Septicemic Cutaneous Ulcerative Disease</i> (Doença ulcerativa cutânea septicémica)
TSA	Teste de sensibilidade aos antibióticos

1. INTRODUÇÃO

O presente relatório de estágio foi desenvolvido com base no estágio efetuado no período de novembro de 2011 a março de 2012, no âmbito do estágio curricular final do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, no Parque Biológico de Gaia.

A partir dos anos 80 o comércio dos répteis disparou (em Portugal/ a nível global), inclusive das tartarugas exóticas e um dos géneros mais representativos foi a tartaruga-da-Flórida (*Trachemys scripta elegans*).

Ao longo dos anos, observou-se que este comércio intensivo de tartarugas exóticas e o seu uso como animais de estimação muitas vezes terminava com a sua libertação no ambiente. O facto de estas tartarugas atingirem um grande tamanho (até 30 cm de comprimento) suscita vários problemas enquanto animais domésticos: a falta de espaço, a exigência de uma limpeza frequente da água e a aquisição e preparação de uma alimentação variada e saudável. Todos estes fatores conduzem a que as pessoas optem pelo caminho mais fácil, ou seja efetuar a sua libertação em zonas húmidas nacionais.

A introdução de espécies exóticas tem sido um dos principais problemas da conservação da biodiversidade. Na Europa, o caso da introdução das tartarugas aquáticas alóctones tem sido especialmente preocupante para as espécies autóctones *Emys orbicularis* (cágado-de-carapaça-estriada) e *Mauremys leprosa* (cágado-mediterrânico). Em Portugal, a espécie *Emys orbicularis* encontra-se em perigo de extinção.

No sentido de reduzir a magnitude deste impacto em Portugal, decorreu um projeto designado por *LIFE-Trachemys*, cofinanciado pela Comissão Europeia, para ser desenvolvido em 29 zonas húmidas de Portugal e da Generalitat Valenciana. O projeto teve início em janeiro de 2011 e um dos principais objetivos foi controlar as populações de tartarugas exóticas invasoras, com vista a promover as populações de tartarugas de água doce nativas. O projeto foi coordenado pela Generalitat Valenciana e teve a participação de três entidades portuguesas: o Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos da Universidade do Porto (CIBIO) e dois centros de recuperação de animais selvagens (Ação, Liberdade, Desenvolvimento, Educação, Investigação e Ambiente (ALDEIA) e Parque Biológico de Gaia (PBG).

Atualmente a libertação de tartarugas exóticas invasoras na natureza é punida por lei, ao abrigo do Decreto de lei nº 565/99 de 21 de dezembro que regula a introdução na natureza de espécies não indígenas da flora e fauna, proíbe a criação ou detenção em local confinado e a utilização como animal de companhia da espécie *Trachemys scripta*, sendo esta condição mais restritiva em relação aos regulamentos comunitários (Regulamento nº 2551/97 e Regulamento nº 349/2003) da Comissão Europeia (CE).

No caso das pessoas que queiram desfazer-se das tartarugas, enquanto animais de companhia, aconselha-se vivamente entregá-los sempre em centros de receção oficiais, como o Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF), o PBG e o Centro de Recuperação e Investigação de Animais Selvagens (RIAS).

O presente relatório resulta do trabalho realizado durante o estágio fundamental no Parque Biológico de Vila Nova de Gaia que durou quatro meses.

A partir das técnicas sistemáticas de estatística descritiva, optou-se por apresentar o total de casos assistidos durante período de estágio, entre novembro de 2011 e março de 2012 e foram contabilizados 453 casos assistidos de animais silvestres e exóticos.

No início deste cálculo estatístico realizou-se a divisão e a classificação dos 453 casos de animais por classe, obtendo-se a frequência absoluta de cada classe. Neste caso, a frequência absoluta representa o número de vezes que um animal pertencente a uma classe ingressou no centro, relativamente ao número total de casos assistidos ($n = 453$). Os resultados representados no gráfico 1 foram os seguintes: assistiu-se 310 casos da classe de Aves, 89 casos da classe de Répteis, 52 casos da classe de Mamíferos, 1 caso da classe de Anfíbios e 1 caso da classe Aracnídeos. Nestes resultados observou-se que a classe de Aves foi a mais representativa e uma das razões que justificou este número elevado foi a localização geográfica deste Centro próxima da costa marítima.

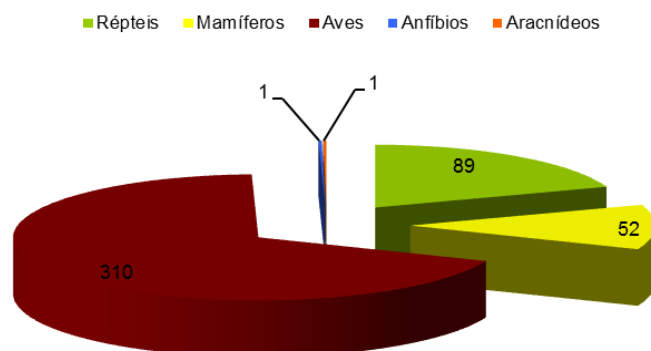


Gráfico 1 – Classe de animais assistidos e suas respectivas frequências absolutas ($n = 453$).

Patologia e clínica de animais exóticos e autóctones

A partir dos resultados das frequências absolutas e dividindo-os pelo número total de casos de animais assistidos, chegou-se à frequência relativa de cada classe. Seguidamente dividiu-se e classificou-se cada classe por ordem, obtendo-se a frequência relativa de cada ordem.

Os resultados da classe de Aves, representados na tabela 1, indicam que houve mais casos de Passeriformes (17%), de Charadriiformes (17%) e de Columbiformes (16%).

Tabela 1 – Tabela de distribuição de frequências relativas de cada ordem da classe de Aves em percentagem (n = 310).

Ordem	Frequência relativa
Charadriiformes	17%
Passeriformes	17%
Columbiformes	16%
Accipitriformes	14%
Psittaciformes	13%
Anseriformes	5%
Strigiformes	5%
Falconiformes	3%
Ciconiiformes	2%
Coraciiformes	2%
Galliformes	2%
Phoenicopteriformes	2%
Apodiformes	1%
Gruiformes	1%
Otidiformes	1%
Pelecaniformes	1%

Quanto aos resultados da classe dos Mamíferos, representados na tabela 2, observaram-se mais casos da ordem Carnívora (65%) e da ordem Rodentia (12%).

Patologia e clínica de animais exóticos e autóctones

Tabela 2 – Tabela de distribuição de frequências relativas de cada ordem da classe de Mamíferos em percentagem (n = 52).

Ordem	Frequência relativa
Carnívora	65%
Rodentia	12%
Artiodactyla	8%
Erinaceomorpha	6%
Lagomorpha	6%
Chiroptera	2%
Perissodactyla	2%

Os resultados da classe de Répteis, representados na tabela 3, foram os seguintes: 94% dos casos foram da ordem Testudines e 6% da ordem Squamata.

Tabela 3 – Tabela de distribuição de frequências relativas de cada ordem da classe de Répteis em percentagem (n = 89).

Ordem	Frequência relativa
Testudines	94%
Squamata	6%

Relativamente à classe de Anfíbios e de Aracnídeos, como se observou apenas um caso de uma salamandra de pintas amarelas (*Salamandra salamandra*) e um caso de um escorpião (*Buthus occitanus*) não se justificou a sua representação gráfica.

Para este estágio foi proposto realizar um estudo sobre as tartarugas exóticas, a partir da realização de necrópsias e, posteriormente, recorrendo à área de histopatologia. A maioria das tartarugas deste estudo teve como origem as capturas realizadas durante o projeto *LIFE-Trachemys*, algumas foram doadas pelo público e outras apreendidas no comércio de animais domésticos.

Os principais objetivos deste trabalho foram:

- Pesquisa bibliográfica e conhecimento sobre as espécies do estudo do género *Trachemys*, *Pseudemys* e *Graptemys*;
- Realização de necrópsias e estudo de alterações, macroscópica e microscópica, dos principais órgãos: coração, fígado, baço, rim e pulmões;
- Estabelecimento de diagnóstico e identificação do tipo de patologias;

- Frequência e caracterização das lesões/patologias das tartarugas exóticas que possam ser um risco e/ou transmissíveis às espécies autóctones.
- Reconhecimento de quais os fatores individuais e epidemiológicos importantes para a potencialidade das tartarugas exóticas serem mais resistentes do que as espécies autóctones.

Dentro do contexto da frequência relativa da ordem Testudines (94%) pertencente à classe de répteis (tabela 3), encontra-se incluído o número de necrópsias realizadas. Num período entre dezembro de 2011 e março de 2012 foram efetuadas 39 necrópsias de tartarugas exóticas e três de tartarugas autóctones. Conforme explicitado no gráfico 2, realizou-se a divisão do número total de necrópsias ($n = 42$) por espécie e sexo, resultando na frequência absoluta de cada espécie. Cada barra do respetivo gráfico encontra-se dividida por género (macho ou fêmea). Observou-se maior percentagem nas espécies *Graptemys pseudogeographica* e *Trachemys scripta*, assim como maior percentagem de indivíduos do sexo feminino (83%) em relação ao sexo masculino (17%).

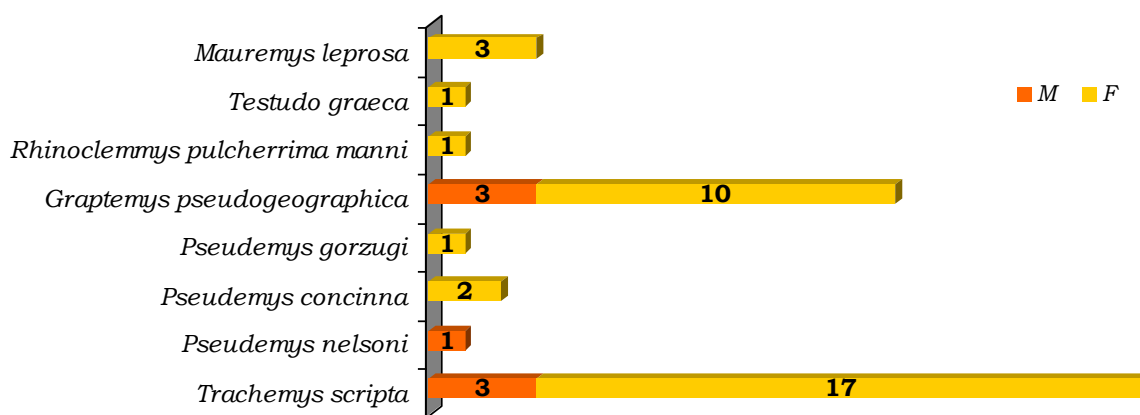


Gráfico 2 – Número de necrópsias realizadas no estudo segundo a espécie e sexo ($n = 42$).

O presente trabalho foi considerado um ensaio, devido à amostra ter sido muito pequena (não sendo representativa da população), sendo que os resultados não são estatisticamente significativos. Todavia, tanto quanto é do nosso conhecimento, este terá sido o primeiro estudo sistemático realizado em Portugal neste contexto.

2. RÉPTEIS

Durante o período Mesozoico, também designado pela Idade dos Répteis, existiam 17 ordens pertencentes a esta classe. Hoje em dia, a classe Reptilia é constituída por quatro ordens: Chelonia ou Testudines (tartarugas marinhas, semiaquáticas e terrestres), Crocodylia (crocodilo, aligador, etc.), Rhynchocephalia (tuatara) e Squamata (camaleões, iguanas, etc.) (Jacobson 2007). Os quelónios (e a tuatara) são os répteis mais antigos à face da Terra, existindo há mais de 200 milhões de anos (Evans 1986).

Os primeiros répteis surgiram na era do Paleozoico aproximadamente há 300 milhões de anos. Devido às semelhanças morfológicas entre os anfíbios e répteis, pensa-se que o ancestral dos répteis terá sido o anfíbio Anthracosaurs (Jacobson 2007). Segundo Evans (1986), os répteis evoluíram a partir dos seus ancestrais anfíbios há 250 milhões de anos (Evans 1986). Hoje em dia, estão distribuídos por todos os continentes, à exceção da Antártida (O'Malley 2005).

A diferença dos primeiros répteis em relação aos seus ancestrais anfíbios pensa-se que tenha sido a forma de reprodução: os anfíbios produzem ovos não amnióticos, enquanto os répteis produzem ovos amnióticos. Os ovos dos anfíbios são gelatinosos, não apresentam membranas extraembrionárias, são suscetíveis à dessecação e a maioria necessita de um ambiente aquático ou húmido para eclodir (Jacobson 2007).

O desenvolvimento do ovo com casca permitiu que os répteis evoluíssem e sobrevivessem no meio terrestre. As membranas extraembrionárias presentes no ovo amniótico são: córion, alantoide, âmnio e o saco vitelino. Este tipo de ovo provavelmente deve ter evoluído, passando por uma série de etapas ao longo do tempo (Packard and Seymour 1997). O ovo dos répteis é mais resistente à dessecação comparado com o dos anfíbios e a grande quantidade de gema no interior do saco vitelino fornece energia e imunoglobulinas maternas que permitem a sobrevivência das crias até um ano de idade (Schumacher, Rostal et al. 1999).

Para além do ovo amniótico, o desenvolvimento de escamas, a evolução do rim metanéfrico (Jacobson 2007), a excreção urinária de ácido úrico (O'Malley 2005) e as modificações músculosqueléticas para a locomoção no meio terrestre são características que diferenciam os répteis dos anfíbios. A presença de escamas, a ausência de

penas/pelos e a ectotermia são características que separam os répteis das aves e dos mamíferos (Jacobson 2007).

Neste trabalho foi necessário estudar as características anatômicas, fisiológicas e histológicas dos quelônios, com o intuito de compreender e interpretar os resultados e obter conclusões.

2.1 QUELÓNIOS

Os Testudines incluem as tartarugas marinhas, semiaquáticas e as terrestres.

Os quelônios surgiram antes dos dinossauros e a sua sobrevivência ao longo da evolução esteve relacionada com o desenvolvimento de uma carapaça primitiva e a capacidade de esconderem as suas cabeças dentro da mesma (King 1996).

Os quelônios têm uma grande capacidade de flexão das suas vértebras cervicais e são classificados de acordo com o modo de retrair as suas cabeças para o interior das carapaças. As duas subordens são os Pleurodira e os Cryptodira (O'Malley 2005).

Os Pleurodira têm três pontos principais de flexão no pescoço apresentando um pescoço em forma de S no sentido horizontal. Estes quelônios são mais primitivos do que os Cryptodira e são incapazes de retrair e esconder a cabeça no interior da carapaça, movimentando apenas a cabeça para os lados ou por baixo da carapaça (O'Malley 2005).

Os Cryptodira têm dois pontos principais de flexão e consequentemente apresentam um pescoço em forma de S no sentido vertical. A capacidade de esconder a cabeça possibilitou o maior sucesso quanto à sobrevivência, sendo esta ordem considerada o maior grupo de espécies de quelônios (Bellairs 1969; Hoffstetter and Gase 1970; King 1996).

2.2. ANATOMIA, FISIOLOGIA E HISTOLOGIA DOS QUELÓNIOS

Dentro do contexto da anatomia, fisiologia e histologia optou-se por descrever os sistemas mais importantes para este estudo que contribuíram para interpretação dos resultados.

2.2.1. Termorregulação

As aves e os mamíferos conseguem controlar a sua temperatura corporal (homeotérmicos) e os répteis dependem de fontes externas para a regulação da mesma (poiquilotérmicos) (Jacobson 2007).

O tipo de fonte de calor que determina a temperatura corporal permite distinguir répteis (ectotérmicos) dos mamíferos e aves (endotérmicos) (Jacobson 2007). Os estudos de Cowles e Bogert (1944) demonstraram que a termorregulação comportamental dos répteis é um fator biológico relevante na vida dos mesmos (Cowles and Bogert 1944).

A maioria dos répteis apresenta um intervalo de temperatura ideal, específico em cada espécie, intervalo esse que depende dos mecanismos comportamentais e fisiológicos. Os limites desse intervalo, principalmente nas espécies de clima temperado, podem variar consoante as estações do ano. Se a temperatura for abaixo do intervalo designa-se por temperatura mínima crítica. Este estado provoca narcose (devido ao frio) e diminuição da locomoção nos animais. Por sua vez, se a temperatura for acima do intervalo, a atividade de locomoção torna-se desorganizada e o animal perde a capacidade de tentar evitar estas condições térmicas, o que poderá conduzir à morte (Lowe and Vance 1955). Nas tartarugas semiaquáticas o intervalo de temperatura ótima é entre os 25°C e os 35°C (Boyer and Boyer 2006).

As tartarugas semiaquáticas exóticas e autóctones hibernam no inverno sendo o intervalo ideal os 2°C e os 10°C (temperatura ideal é os 5°C) (Highfield 1996).

2.2.2. Sistema músculosquelético

O esqueleto apendicular das tartarugas é quadrúpede e geralmente apresentam membros pentadátilos que se prolongam no sentido lateral comparativamente aos mamíferos, embora existam exceções (McArthur, Meyer et al. 2008). Os quelónios são os únicos tetrápodes com membros no interior da carapaça. Estes encontram-se fundidos na carapaça, no caso dos Pleurodira, ao contrário dos Cryptodira (McArthur, Meyer et al. 2008). A maioria das vértebras, juntamente com as costelas, apresenta-se fundida com o osso dérmico e o tecido conjuntivo fibroso da carapaça, exceto as vértebras cervicais e caudais. Nos quelónios não existe esterno (McArthur, Meyer et al. 2008).

A carapaça de uma tartaruga é constituída pela parte superior designada por carapaça e pela parte inferior denominada por plastrão. A carapaça e o plastrão unem-se lateralmente a partir das pontes ósseas. É constituída por 50 ossos derivados da fusão de costelas, vértebras e elementos dérmicos da pele. O plastrão resulta da fusão de clavículas, interclavículas e costelas abdominais (Boyer and Boyer 2006).

O bico dos quelónios é semelhante ao das aves. O bico córneo queratinizado superior é conhecido por ranfoteca e sobrepõe-se aos ossos mandibulares. O ramo mandibular, cujo bico córneo se encontra anexado, é conhecido por dentário. Este não apresenta dentição, mas é essencial para apreensão dos alimentos (McArthur, Meyer et al. 2008). O crânio dos quelónios é largo e não apresenta articulações, exceto a mandíbula (Bellairs and Kamal 1981). Os músculos mandibulares são enervados pelo nervo trigémeo (Schumacher 1973) e têm como função encerrar a mandíbula.

2.2.3. Sistema Tegumentar

Nas tartarugas o tegumento desempenha um papel importante para a conservação dos fluidos corporais, formando uma barreira de proteção entre os tecidos profundos e o meio ambiente, assim como também desempenha o papel de proteção contra a invasão por agentes patogénicos. A estrutura da pele dos quelónios tem a capacidade de resistir a desafios agressivos de uma diversidade de habitats, nomeadamente nos habitats áridos e abrasivos, assim como nos aquáticos. A pele dos quelónios é resistente à exposição intensa de radiação ultravioleta (McArthur 2008 a).

A pele pode ser grossa e escamosa como nas tartarugas terrestres ou lisa como nas tartarugas aquáticas e semiaquáticas.

A estrutura da pele das tartarugas é composta por uma epiderme exterior com escamas e por uma camada profunda a derme (responsável pelo suporte, nutrição e coloração da epiderme) (Davies 1981). A pele apresenta estruturas glandulares limitadas em comparação com a dos mamíferos. A muda das escamas tende a ser contínua e não coordenada ao longo da sua vida. Muitas vezes são libertados fragmentos em áreas restritas do tegumento, principalmente em zonas flexíveis e moles, como por exemplo no pescoço e nas partes proximais dos membros, onde ocorrem regularmente movimentos de fricção (McArthur 2008 a).

O tegumento dos répteis é constituído por queratina α e β , e no caso dos quelónios é constituído pelos dois tipos de queratina. As escamas apresentam-se de forma alternada no sentido horizontal (Maderson 1985).

A carapaça é coberta por um tecido epidérmico, normalmente em forma de placas queratinizadas conhecidas por escudos, embora nalgumas espécies aquáticas e semiaquáticas esta seja envolvida por um tipo de pele. À medida que os quelónios crescem, novas camadas destas placas epidérmicas são adicionadas (principalmente nas

suturas), contudo, a contagem das mesmas não é um método fiável para determinar a idade. Nas espécies semiaquáticas, ao longo da vida os escudos (placas epidérmicas) são libertados regularmente, ao contrário das espécies terrestres que a libertação das mesmas é rara. As tartarugas muito jovens apresentam uma carapaça moderadamente flexível sob circunstâncias normais, mas a maioria endurece rapidamente na calcificação juvenil. O crescimento ocorre nos escudos periféricos (McArthur, Meyer et al. 2008).

A maioria dos quelónios apresenta uma carapaça com escudos constituídos por β -queratina (Jacobson 2007). A carapaça dos quelónios é um exemplo de esqueleto dérmico, constituído por um osso membranoso, onde não se encontram vestígios de cartilagem (McArthur 2008 a).

2.2.4. Cavidades Corporais

Os quelónios possuem uma única cavidade pleuroperitoneal ou celómica. Esta cavidade é dividida por uma membrana pleuroperitoneal horizontal, designada por septo horizontal que separa os pulmões, situados numa posição dorsal, das vísceras que se encontram numa posição ventral. Não existe cavidade torácica e abdominal (McArthur 2008 b).

2.2.5. Sistema Respiratório

Trato Respiratório Superior

É constituído pelas narinas exteriores, pelo vestíbulo queratinizado e pela orofaringe. O vestíbulo queratinizado é formado por um epitélio dorsal olfatório e por um epitélio ventral mucoso. Este vestíbulo é dividido cranialmente pelo septo cartilaginoso em câmara nasal direita e esquerda. O vestíbulo não apresenta turbinados nem seios nasais e prolonga-se caudalmente para uma simples passagem situada sobre o palato duro. O vestíbulo termina na coana, onde apresenta uma abertura para a faringe a partir de um recesso ventral (McArthur 2008 c). Não existe palato mole (Fowler 1980; Jacobson 1997). No que diz respeito à presença ou ausência do órgão vomeronasal dos quelónios não existem conclusões relevantes.

Trato Respiratório Inferior

É constituído pela glote, laringe, traqueia, um par de brônquios e um par de pulmões. A traqueia, os brônquios e os pulmões são revestidos por um epitélio glandular ciliado (Fowler 1980). Segundo Jacobson (2007) são revestidos por células

epiteliais basais e secretoras ciliadas ou não ciliadas (Jacobson 2007). Os quelônios apresentam a divisão da traqueia mais cranial em relação às outras espécies, no entanto a respiração não é interrompida quando a cabeça e o pescoço da tartaruga se encontram no interior da carapaça (Frye 1991 a).

Todos os quelônios têm brônquios não ramificados que atravessam todo o comprimento dos pulmões. Dependendo da espécie de quelônios, o pulmão pode encontrar-se dividido em três a onze câmaras (Perry 1998). A abertura das câmaras encontra-se direcionada para o brônquio intrapulmonar central (Fleetwood and Munnell 1996).

A zona respiratória do pulmão é dividida e subdividida por septos ou por trabéculas interconectados em unidades de trocas gasosas, designadas por *faveolae* ou *ediculae*. Esta divisão faz com que o pulmão revele no seu interior um aspeto de favos de mel ou de esponja. As unidades, onde ocorrem as trocas gasosas, designadas por *faveolae* são câmaras que apresentam mais profundidade do que largura, ao contrário das *ediculae*. As *faveolae* e *ediculae* encontram-se adjacentes, mas separadas por um septo de tecido conjuntivo, contendo vasos sanguíneos e ocasionalmente aglomerados de células linfóides. No final do septo e contornando cada *faveolae* ou *ediculae*, encontra-se um cordão de células de músculo liso (Jacobson 2007).

Embora os pulmões sejam de grandes dimensões e segmentados, a área de superfície respiratória é inferior em relação à dos mamíferos, no entanto encontram-se adaptados a animais cujo metabolismo é baixo (Wood and Lenfant 1976).

O pulmão pode desempenhar um papel de órgão de flutuação em muitas espécies de tartarugas aquáticas e semiaquáticas.

Função do sistema respiratório

Os quelônios não apresentam diafragma funcional que separe as cavidades torácica e abdominal, no entanto os pulmões são separados entre si por uma membrana vertical forte. A presença de uma carapaça rígida impede a ventilação a partir de movimentos costais. O movimento dos membros associado à massa muscular provoca simultaneamente movimento visceral e acaba por ser responsável pela variação da pressão intrapulmonar. O septo horizontal ou pseudodiafragma separa a cavidade celômica das vias aéreas, no entanto, ao contrário do diafragma dos mamíferos, esta membrana não apresenta movimentos musculares para auxiliar a ventilação. A pressão

intratorácica negativa induzida pelo diafragma para ocorrer a insuflação dos pulmões não acontece nos quelónios e por esta razão a respiração pode ser mantida na presença de fraturas da carapaça (Boyer and Boyer 2006; McArthur 2008 c) sem que ocorra stress respiratório como nos mamíferos (Murray 1996).

Apenas os movimentos musculares antagonistas, anteriormente descritos, dos membros pélvicos e peitorais são responsáveis pela insuflação (Gans and Hughes 1967; Wood and Lenfant 1976; Davies 1981). O septo horizontal é efetivamente esticado ou puxado para baixo, a partir dos movimentos dos membros criando um aumento da área ocupada pelos pulmões que normalmente são pressionados pela carapaça e pelo septo, este movimento facilita a inspiração.

Os quelónios apresentam no seu trato respiratório inferior uma fraca capacidade de remoção de secreções ou materiais estranhos e são incapazes de tossir por não terem um diafragma muscular. O sistema muco-ciliar que permite limpar as vias aéreas não se encontra presente a partir da glote em direção às vias respiratórias inferiores (Frye, 1991a; Murray 1996). Estes animais também apresentam uma fraca drenagem no interior dos brônquios. Portanto, todos estes fatores contribuem para um maior risco de desenvolvimento de pneumonia, assim como o facto do espaço interior do pulmão ser grande e conter pequenos compartimentos (Murray 1996).

Segundo Boyer & Boyer (1996) estas características são a razão pela qual os quelónios apresentam casos de pneumonia graves (Boyer and Boyer 2006). De acordo com Fowler (1978) e Murray (1996) os exsudados inflamatórios associados a doenças infecciosas tendem a acumular-se em áreas do pulmão, impedindo a sua eliminação através dos brônquios e da traqueia (Fowler 1978; Murray 1996).

Num estudo de Frye (1991) foi demonstrado em atmosfera de azoto puro a capacidade das tartarugas suportarem ambientes anaeróbicos, recorrendo à via respiratória glicolítica (Frye 1991 a). Noutro estudo, a *Trachemys scripta elegans* sobreviveu 27 horas num ambiente de azoto a 100% (Johlin and Moreland 1933). Assim sendo, compreende-se a razão pela qual estas tartarugas conseguem sobreviver perante infeções respiratórias crónicas fatais, em relação aos vertebrados superiores que não têm a capacidade de respirar anaerobiamente.

Respiração de quelónios semiaquáticos

Os quelônios, em terra, apresentam uma inspiração passiva e uma expiração ativa, no entanto, na água, a situação é inversa devido ao efeito da pressão hidrostática sobre o volume visceral (Jackson 1971; Wood and Lenfant 1976).

Wood e Lenfant (1976) descrevem o reflexo do mergulho na espécie *Chelonia mydas*. Nesta espécie, após 20 minutos de mergulho, observou-se simultaneamente um aumento da frequência cardíaca e da velocidade do fluxo de sangue na artéria pulmonar, maximizando a troca gasosa (Wood and Lenfant 1976). Muitas tartarugas aquáticas utilizam a respiração extrapulmonar durante os períodos de inatividade ou hibernação, no entanto nos períodos de atividade devem vir à superfície para respirar (Boyer and Boyer 2006).

O movimento de bombeamento gular (circulação de água entre a boca, faringe e coana como resultado dos movimentos do aparelho digestivo superior) encontra-se descrito nalgumas tartarugas que são capazes de permanecer submersas durante várias horas (McArthur 2008 c). Wood e Lenfant (1976), assim como também Davies (1981), sugerem que este movimento auxilie no olfato e não na respiração (Wood and Lenfant 1976; Davies 1981).

A respiração extrapulmonar nas tartarugas semiaquáticas pode incluir a faringe, a bursa cloacal e a pele (pequena percentagem) (Davies 1981). De acordo com Jackson e Schmidt-Nielson (1966) as trocas de oxigénio extrapulmonar são limitadas nas espécies semiaquáticas, tais como na *Trachemys scripta* (Jackson and Schmidt - Nielson 1966).

Num estudo de Hitzig e Jackson (1978) sobre o controlo químico central da ventilação, constatou-se que a diminuição do potencial hidrogeniónico (pH) aumentou a taxa de ventilação (também constatou-se em casos de alcalose acentuada no sangue arterial) (Hitzig and Jackson 1978). Segundo o estudo de Ishii e Ishii (1986) sobre os quimiorrecetores e barorrecetores na artéria carótida dorsal, foi demonstrado o aumento da frequência de impulso num ramo de nervos finos do nervo glossofaríngeo, em resposta à hipoxia, hipercapnia e outros químicos. Os autores concluíram da presença de quimiorrecetores e barorrecetores na artéria carótida dorsal, na aorta e na artéria pulmonar. Estes podem desempenhar um papel crucial no controlo homeostático da ventilação e induzir a resistência vascular (Ishii and Ishii 1986).

Segundo Bennett (1998), muitos quelônios podem detetar um ambiente com níveis baixos de oxigénio, entrando numa fase de apneia, recorrendo ao metabolismo anaeróbico. Estes mecanismos fisiológicos, como a respiração anaeróbica e encerramento cardíaco adaptam-se ao mergulho e à hibernação, mas podem originar complicações na anestesia inalatória e nas técnicas de eutanásia (utilizando drogas cardioplégicas) (Bennett 1998).

2.2.6. Sistema Digestivo

Trato Digestivo Superior

É constituído pelo bico/mandíbula, cavidade oral (língua, orofaringe e coana), faringe e esófago (McArthur and Meyer 2008).

Do ponto de vista histológico, a cavidade oral é formada por uma mucosa que inclui células epiteliais escamosas não queratinizadas, células epiteliais ciliadas, células *goblet* e células epiteliais colunares. Apresenta glândulas labiais, sublinguais e linguais.

A língua dos quelônios apresenta na superfície dorsal projeções papilares que são constituídas por epitélio escamoso estratificado não queratinizado. A superfície ventral da língua é lisa e coberta por um epitélio escamoso e queratinizado (Jacobson 2007).

A maioria dos répteis apresenta um esófago com pregas de coloração pálida, revestido por epitélio mucoso (múltiplas camadas), formado por células epiteliais ciliadas e *goblet*. A camada muscular da parede do esófago é ausente na maioria dos quelônios, à exceção das tartarugas terrestres e marinhas (Jacobson 2007). O esófago situa-se no lado esquerdo do pescoço e pode desempenhar uma função de ação mecânica sobre os alimentos ou de digestão (Skoczylas 1978).

Trato Digestivo Inferior

É constituído pelo estômago, intestino delgado, intestino grosso e cloaca. O pâncreas e o fígado também apresentam um papel importante na digestão. O estômago, de forma fusiforme e simples, localiza-se ao longo da face caudal do fígado (*fundus* no lado esquerdo do fígado e o piloro no centro ou no lado direito) (McArthur and Meyer 2008). Tal como nos mamíferos, o estômago dos quelônios apresenta grande e pequena curvatura. Um esfíncter delimita a transição do esófago para o estômago. A mucosa do estômago apresenta pregas longitudinais e uma coloração castanho clara (Jacobson 2007). Geralmente observam-se duas zonas distintas: o *corpus* (*fundus*) e a parte

pilórica (Luppa 1977). Do ponto vista histológico, a maioria da mucosa do estômago é constituída por um epitélio glandular. A mucosa na zona fúndica é formada por várias filas de glândulas tubulares e ramificadas (mais frequente), pode ser dividida por uma zona de fendas pequenas e pela zona glandular. Dependendo do grupo de répteis, a região glandular apresenta um ou dois tipos de células: as células serosas escuras (oxitínico-péptido) e as células claras (mucosas). As células escuras têm a função semelhante à das células parietais e principais. As células pertencentes ao epitélio glandular do estômago e do trato intestinal têm a função enteroendócrina. Por baixo das células epiteliais da mucosa do estômago e da região glandular encontra-se a lâmina própria, a camada muscular (camada interna circular e camada externa longitudinal), a submucosa, a túnica muscular (camada interna espessa e circular, camada externa fina e longitudinal) e a serosa. A mucosa da zona pilórica apresenta glândulas tubulares pequenas, pouco ramificadas e alinhadas com as células mucosas. Nos quelônios a zona pilórica é proeminente e muscular (Jacobson 2007).

O intestino delgado situa-se na cavidade celômica caudal e não se encontra distintamente dividido em duodeno, jejuno e íleo (Guard 1980). O duodeno atravessa diretamente a face caudal do fígado e encontra-se conectado ao mesmo pelo ligamento hepatoduodenal. As artérias pancreoduodenais fornecem sangue arterial, enquanto a veia duodenal transporta o sangue venoso para a veia porta (Ashley 1955). A porção descendente do duodeno é diretamente ligada à membrana pleuroperitoneal dorsal, responsável por fixar o intestino na sua posição anatômica. O restante intestino delgado é suspenso pelo mesentério *proprium*. O duodeno entra no ceco medialmente e observa-se uma válvula muscular proeminente (Guard 1980). O fornecimento de sangue para o duodeno nesta área provém da artéria mesentérica cranial (Ashley 1955; Guibé 1970). No duodeno encontram-se as enzimas gástricas, pancreáticas, biliares e secreções intestinais, cujo pH é geralmente alcalino (ou ligeiramente ácido) (Jacobson 2007).

O intestino delgado das tartarugas apresenta-se anatomicamente contorcido, a mucosa pode ter pregas longitudinais e transversais, padrão em ziguezague, rede ou favos de mel, assim como pequenas estrias (Parsons and Cameron 1977). O epitélio da mucosa do intestino encontra-se organizado em vilosidades e no caso das tartarugas apresenta criptas intestinais de epitélio glandular (Luppa 1977). O epitélio da mucosa é

constituído por células epiteliais de absorção e *goblet*. As células de *Paneth* e as enteroendócrinas também se encontram presentes no epitélio intestinal (Jacobson 2007).

A localização onde ocorre a renovação das células intestinais presentes nas criptas de *Lieberkühn* dos mamíferos é desconhecida nos répteis. Por baixo do epitélio, encontra-se a lâmina própria que apresenta vasos sanguíneos e tecido conjuntivo. A camada muscular é muito fina, formada por uma camada simples de células musculares, de seguida surge a submucosa, a túnica muscular e a serosa. Os répteis herbívoros apresentam um intestino delgado mais comprido do que os répteis carnívoros (Jacobson 2007).

O intestino grosso inicia-se com o cólon, sendo este mais comprido e largo nos répteis herbívoros do que nos carnívoros (Jacobson 2007; McArthur and Meyer 2008). Localiza-se na zona caudal direita da cavidade celômica e não se considera o cólon como um órgão individual, mas é apenas o aumento de largura da parede do intestino grosso (Ashley 1955; Guibé 1970). O intestino grosso pode ser dividido em cólon ascendente, transverso e descendente. A porção ascendente e descendente encontram-se fixadas à membrana pleuroperitoneal dorsal a partir de um ligamento curto, sendo que a porção transversa, a mais flexível, encontra-se ligada ao estômago a partir do *mesogastrium*. Esta característica anatômica faz com que o cólon transverso se movimente no sentido dorsoventral, tornando-se mais predisposto a impatações por materiais pesados, como resultado da gravidade (Meyer 1996).

A mucosa do cólon pode apresentar pregas ou não. Os quelónios herbívoros podem ter a porção cranial do cólon, subdividida em pequenos compartimentos e frequentemente podem apresentar nematodes oxiúros nesta zona. O cólon cranial não apresenta criptas. A mucosa do cólon é constituída por uma camada simples de células epiteliais, contendo mucina ou mucos, e células epiteliais de absorção (Jacobson 2007). Tal como no intestino delgado, o fornecimento de sangue no intestino grosso é feito a partir do ramo mesentérico comum (Guibé 1970).

A cloaca é dividida em coprodeu, urodeu e proctodeu. O urodeu é a porção mais cranial e recebe a abertura dos ureteres, do oviduto ou duto deferente e da bexiga. O cólon termina no coprodeu, onde uma prega proeminente separa a abertura do cólon do urodeu. No fim, o proctodeu recebe o conteúdo do urodeu e do coprodeu, sendo este considerado a zona mais caudal da cloaca que abre para o exterior (McArthur and

Meyer 2008). A cloaca é constituída por células epiteliais colunares, incluindo células *goblet*/marginais e apresenta também uma variedade de glândulas (Jacobson 2007).

A fisiologia do trato gastrointestinal é afetada pelo ambiente e pela temperatura corporal dos répteis, incluindo a taxa de decomposição de alimentos ingeridos, a taxa de transição dos alimentos, a motilidade do trato e a taxa de absorção. As espécies que hibernam entram normalmente na fase inicial de hibernação com a porção proximal do trato gastrointestinal vazio (Jacobson 2007). Este fenómeno é considerado um comportamento de defesa dos quelónios, de forma a não manterem alimento no interior do trato gastrointestinal que possa entrar em decomposição durante a hibernação; caso contrário pode proporcionar o desenvolvimento de infeção bacteriana e posteriormente septicémia.

Fígado

O fígado dos répteis é bilobulado, apresenta uma coloração vermelha escura ou castanha escura e é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo, a cápsula de Glisson (Schaffner 1998). Nos répteis neonatos e juvenis o fígado pode ter uma coloração pálida. Os quelónios apresentam o lobo esquerdo menor do que o direito e encontra-se associado diretamente com a pequena curvatura do estômago a partir do ligamento gastrohepático. O lobo direito do fígado dos quelónios encontra-se adjacente ao duodeno a partir do ligamento hepatoduodenal e a vesícula biliar localiza-se no interior do lobo direito. Os ductos biliares transportam a bÍlis da vesícula biliar para o duodeno. A veia porta situa-se na superfície dorsal do fígado, a veia hepática localiza-se na superfície ventral e ambas atravessam todo o comprimento do fígado, dividindo-o em dois lobos. A veia hepática sai do fígado e junta-se à veia pós-cava (Jacobson 2007).

Do ponto vista histológico, o fígado não se encontra organizado em lóbulos como nos mamíferos (Schaffner 1998). Nalguns répteis, os cordões hepáticos podem encontrar-se distribuídos à volta da veia central. A camada de tecido conjuntivo proeminente não separa os lóbulos adjacentes. A periferia pode incluir um ducto biliar, uma rede de veias hepáticas e quantidades pequenas de tecido conjuntivo. A rede da artéria hepática pode ou não estar presente. Tal como nos mamíferos, os cordões hepáticos são separados pelas sinusoides que são constituídas por células Kupffer e células endoteliais. As células Stellate ou Ito têm sido identificadas nos sinusoides hepáticos dos répteis. As células Kupffer desempenham um papel semelhante ao dos

macrófagos e as células Ito são o principal local de armazenamento da vitamina A. Os melanomacrófagos são frequentemente observados no fígado dos répteis. Os *clusters* (agregados) dos melanomacrófagos são muitas vezes designados como centros melanomacrofágicos. Estas células desempenham a função imunitária como os linfócitos, macrófagos, plasmócitos e células reticulares. O pigmento castanho observado nos melanomacrófagos com a coloração hematoxilina e eosina consiste na presença dos grânulos de ferro e melanina. Em muitas doenças, especialmente doenças crónicas, os centros melanomacrofágicos podem aumentar de tamanho e número (Jacobson 2007).

Algumas das funções hepáticas incluem o metabolismo de lípidos, de glicogénio e de proteínas. As enzimas responsáveis pela degradação de nucleótidos e purina em produtos finais de excreção, tais como o ácido úrico, encontram-se no fígado. O fígado também apresenta a função de armazenamento principal de energia e de ácidos gordos. Tal como nos outros vertebrados, o fígado dos quelónios encontra-se envolvido nos processos homeostáticos e mecanismos de síntese, como por exemplo o processo de ativação parcial de vitamina D (calcitriol) (McArthur and Meyer 2008).

As funções do fígado são afetadas perante determinados acontecimentos anuais, tais como a hibernação, onde grandes quantidades de gordura são armazenadas temporariamente e na reprodução das fêmeas quando a vitelogénese e o aumento de síntese proteica prevalece. Em ambas as situações o fígado pode aumentar de tamanho e ficar com uma cor pálida e textura mole. As alterações no fígado associadas com a estação do ano, o ciclo reprodutivo e o metabolismo na hibernação devem ser distinguidas de uma doença hepática primária, de alterações associadas à anorexia e outras condições de doença (McArthur and Meyer 2008).

Num estudo de Ferrer (1987), este recolheu amostras de fígado na época de hibernação e na época de atividade do animal e comparou-as a partir da observação microscópica ótica e eletrónica (Ferrer 1987). Durante a hibernação foram observadas as alterações sazonais na estrutura e na função do fígado com a diminuição da síntese, armazenamento e libertação de produtos hepáticos. No estado de atividade aconteceu o inverso à medida que o metabolismo aumentava.

Os ácidos biliares produzidos pelos quelónios têm características químicas (do tipo estrutural) não encontradas noutros vertebrados (Skoczylas 1978). Estas

caraterísticas apoiam a teoria da separação precoce das tartarugas do ramo dos outros répteis, durante a sua evolução. Os ácidos biliares ajudam na digestão, conjuntamente com as lípases, formando soluções micelares de triglicéridos, que são depois sujeitas à absorção. Os sais biliares facilitam a absorção dos ácidos gordos, monoglicéridos, colesterol, vitaminas lipossolúveis, fosfato de cálcio e possivelmente outros catiões diferentes (Skoczylas 1978). Os ácidos gordos são descritos por Derickson (1976) e Elkan (1980) e existem mais nas espécies de clima temperado do que nas espécies de clima tropical (Elkan 1980), no entanto as suas funções são pouco definidas (Derickson 1976; Elkan 1980).

Na maioria dos quelónios, o pâncreas encontra-se adjacente à parte proximal do duodeno, no bordo mesentérico do mesmo (Miller and Lagios 1970; McArthur and Meyer 2008). Segundo um estudo de Ashley (1955) o pâncreas encontra-se ligado ao duodeno a partir do ducto pancreático. O fornecimento de sangue para o pâncreas faz-se a partir dos ramos da artéria celíaca e seguidamente é drenado pelas veias do sistema porta-hepático (Ashley 1955). O pâncreas exócrino é constituído por túbulos ramificados que contêm células epiteliais com grânulos zimogénicos. Ao contrário dos mamíferos, não existe uma zona intercalada ou transicional e a presença de ilhotas Langerhans. Não apresenta divisão da zona medular do córtex e não há distinção entre o pâncreas exócrino e endócrino (Jacobson 2007).

As funções endócrinas e exócrinas do pâncreas são semelhantes à dos vertebrados. O tipo de enzimas presente no pâncreas depende do tipo de alimentação do animal, por exemplo nas espécies herbívoras não existe a quitinase, ao contrário do que sucede na *Mauremys caspica*, cuja alimentação é à base de crustáceos. A capacidade de sintetização do pâncreas permite adaptar a composição enzimática da secreção pancreática à dieta (McArthur and Meyer 2008).

2.2.7. Sistema Urinário

O sistema urinário é constituído por um par de rins, ureteres e uma bexiga (Jacobson 2007). Os rins dos quelónios encontram-se localizados na cavidade retrocelómica caudal e estão muitas vezes associados à carapaça na posição cranial aos membros pélvicos. A porção caudal do pulmão e a carapaça encontram-se dorsais relativamente aos rins. Nos quelónios machos os rins encontram-se próximos das gónadas (testículos) e são confundidos com as mesmas no exame *pos mortem* ou na

exploração celômica (Mader 1997). Nas fêmeas, os rins encontram-se fora da membrana celômica e em frente dos membros pélvicos. Os ovários e os ovidutos encontram-se em frente dos rins, mas no interior da cavidade celômica (McArthur 2008 d).

Os rins dos répteis são lobulados, do mesmo tamanho e de coloração castanho claro ou escuro. Algumas espécies apresentam o rim direito maior que o esquerdo. Relativamente aos quelônios, os rins são pequenos, largos, localizam-se próximo do canal pélvico, têm os ureteres, os ovidutos ou vasos deferentes separados e a abertura destes últimos encontra-se na cloaca (Jacobson 2007).

O rim dos répteis tem uma estrutura metanéfrica muito desenvolvida, típica dos grandes vertebrados, no entanto não apresenta ansa de Henle, nem pélvis renal (McArthur 2008 a; McArthur 2008 d). Tal como nos outros grupos de vertebrados, a unidade estrutural e funcional dos rins é o nefrónio, constituído pela cápsula de Bowman e um glomérulo. A cápsula de Bowman é formada por um epitélio capsular externo (parietal) e um epitélio glomerular interno (visceral). Na maioria dos répteis existe um epitélio capsular escamoso. Comparado com os anfíbios, nos répteis existe uma redução definitiva no tamanho dos glomérulos. Esta situação é uma adaptação dos répteis para conservar a água, reduzindo o fluxo da urina nos túbulos. O glomérulo dos répteis não é vascular como nas aves e mamíferos (Jacobson 2007). Vários segmentos do nefrónio dos répteis podem ser distinguidos histologicamente (Bishop 1959). Depois da cápsula de Bowman segue-se o segmento do colo (não secretório) que apresenta células cuboidais (muitas têm cílios), cujo núcleo ocupa a maior parte do citoplasma. A seguir ao segmento do colo segue o segmento proximal que inclui os túbulos proximais. Os túbulos proximais apresentam células cuboidais que não apresentam cílios, mas têm microvilosidades bem desenvolvidas na mucosa superficial do lúmen. A seguir segue o segmento intermediário que tem inicialmente uma região ciliada e posteriormente uma área de células mucosas. As células deste segmento são semelhantes às células do segmento do colo. Finalmente segue-se o segmento distal que liga aos túbulos coletores (Jacobson 2007).

A seguir aos túbulos coletores, surgem os ureteres bilaterais que entram no urodeu da cloaca no sentido dorsal. O urodeu permite que a urina passe para a bexiga (no sentido cranial) ou para o coprodeu (no sentido caudal), onde se mistura com as

fezes. Algumas tartarugas semiaquáticas têm duas pequenas bexigas acessórias fixadas ao urodeu. Uma pequena uretra entra na bexiga a partir do chão ventral medial do urodeu (Mader 1997).

No rim, o sangue arterial é fornecido por várias artérias renais do ramo da aorta. O sangue entra no nefrônio a partir da arteríola aferente que forma uma rede capilar glomerular, a qual é envolvida pela cápsula Bowman e sai pela arteríola eferente que fornece sangue às células dos túbulos (Holz 2006).

Fisiologia Urinária

As funções dos rins dos répteis incluem: osmorregulação, regulação no equilíbrio hídrico, excreção de produtos metabólicos e produção de hormonas e metabolitos de vitamina D (Moyle 1949; Dantzler and Schmidt - Nielson 1966; Dantzler 1976; Minnich 1982; Mader 1997).

Na literatura, a produção de eritropoietina e a ativação de precursores da vitamina D a partir dos rins não se encontra bem documentado, mas pode ser semelhante como nos grandes vertebrados (McArthur 2008 d).

Nalgumas espécies de quelônios, os rins e a bexiga podem estar envolvidos na excreção de eletrólitos e no equilíbrio hídrico (Jorgensen 1998). Segundo os autores Moyle (1949), Dantzler (1976) e Minnich (1982) os rins dos répteis são incapazes de concentrar a urina acima da osmolaridade do sangue (Moyle 1949; Dantzler 1976; Minnich 1982; Jacobson 2007). Da água filtrada pelos rins, apenas 30 a 50% é reabsorvida nos túbulos proximais, em relação aos 60 a 80% dos mamíferos (Holz 2006).

Segundo o estudo de Dantzler e Schmidt-Nielson (1966) demonstraram que a tartaruga *Gopherus agassizii* apresenta urina hipotónica no interior dos túbulos renais e ureteres e esta se torna isotónica no interior da bexiga (Dantzler and Schmidt - Nielson 1966). A urina hipotónica reduz o risco de precipitação de uratos no interior dos túbulos, durante os períodos de desidratação em quelônios uricotélicos (Minnich 1982). Nestes quelônios, também o rim secreta substâncias mucoides que contêm glicoproteínas ou mucopolissacáridos que ajudam à formação de esferas de ácido úrico e previnem a acumulação das mesmas nos ductos coletores. Consequentemente, a urina uretral dos répteis contém uma grande quantidade de proteínas, ao contrário dos

mamíferos. No entanto, o animal não perde a proteína, esta é reabsorvida no reto (Holz 2006).

Nos quelónios o nitrogénio urinário é excretado sob a forma de amónia, ureia, ácido úrico, aminoácidos, alantoide, guanina, xantina e creatinina (Moyle 1949; Khalil and Haggag 1955; Dantzler and Schmidt - Nielson 1966; Dantzler 1976).

Existem quatro padrões diferentes de excreção nos quelónios: os uricotélicos (ácido úrico e uratos), ureotélicos (ureia), amino-ureotélicos (combinação de amónio e ureia) e ureo-uricotélicos (ácido úrico e ureia). Os padrões de excreção encontram-se relacionados com o tipo de habitat de cada espécie. Conforme ilustrado na tabela 4, os quelónios de ambientes húmidos, onde a água se encontra presente, excretam uma combinação de amónio e ureia. As tartarugas semiaquáticas, por exemplo a *Trachemys scripta*, são predominantemente amino-ureotélicas. A ureia é altamente solúvel em água e facilmente atravessa as membranas biológicas. Neste sentido, como os quelónios não conseguem concentrar urina, a ureia deve ser eliminada em grandes quantidades de água (McArthur 2008 d).

As tartarugas de água doce excretam mais de 25% de amónio no total de percentagem de nitrogénio urinário. Conforme representado na tabela 4, as tartarugas *Trachemys scripta* excretam aproximadamente duas a quatro vezes mais ureia do que amónio ou ácido úrico (Jacobson 2007).

Tabela 4 – **Distribuição de produtos de nitrogénio excretados pelos quelónios em diferentes ambientes.** Adaptado de Dantzler, W. H. and B. Schmidt-Nielson (1966) e de Moyle, V. (1949).

Habitat	Percentagem de nitrogénio urinário total em:		
Espécies	Amónio	Ureia	Ácido úrico
Terrestres <i>Gopherus agassizii</i>	3 – 8	15 – 50	20 – 50
Aquáticas	20 – 25	20 – 25	5
Semiaquáticas <i>Trachemys scripta</i>	4 – 44	45 – 95	1 – 24

O sistema porta-renal nos quelónios inicia-se com as veias caudais que transportam o sangue da cauda e com as veias ilíacas que transportam o sangue dos membros posteriores. Estas veias unem-se formando as veias porta-renais aferentes que entram no rim. No rim, o sangue entra para uma série de capilares que realizam a

perusão das células tubulares renais. O sangue venoso mistura-se com o sangue da arteríola eferente no início do túbulo proximal. Em seguida, o sangue sai pelas veias porta-renais eferentes que se unem e formam a veia pós-cava que se dirige para o coração (Holz 2006). Nos quelônios, as veias pélvicas juntam-se às veias ilíacas antes de estas se unirem com as veias caudais e formarem as veias porta-renais aferentes. No entanto, estas veias podem transportar o sangue para as veias abdominais ventrais que por sua vez transportam o sangue para o fígado. Estas duas veias apresentam uma anastomose transversa (Holz 1999 a). Portanto, o sangue pode passar para o interior do rim ou passar para o fígado e nos casos de desidratação do animal o sangue passa preferencialmente pelo interior dos rins. Existe uma válvula responsável pela alteração do sentido do sangue, sendo desconhecidos os fatores que controlam a mesma (Rennick and Gandia 1954; Holz, Barker et al. 1997).

Os répteis apresentam uma taxa de filtração glomerular baixa, devido à pressão sanguínea ser baixa, podendo diminuir ainda mais como método de conservação da água. Esta diminuição encontra-se sob o efeito da arginina vasopressina produzida pela glândula hipófise que induz a vasoconstrição da arteríola aferente. O resultado é que o glomérulo fecha-se, o túbulo colapsa e termina o transporte de sangue ao longo do epitélio tubular (Schmidt - Nielsen and Davies 1968). O bloqueio do fluxo sanguíneo para o interior do glomérulo implica o risco das células tubulares sofrerem necrose isquémica e para prevenir este acontecimento o sangue do sistema porta renal continua a perusão sanguínea tubular, mantendo as células vivas (Holz 2006).

Bexiga

Os ureteres esvaziam para o urodeu, onde a urina pode ir para a bexiga, quando é necessário absorver água ou passa diretamente para o coprodeu, sendo a bexiga evitada (McArthur 2008 d). A parede da bexiga é muito distensível, constituída por bandas musculares finas e por células ciliadas (epitélio transicional) que secretam muco, facilitando a eliminação dos cristais de uratos (Jacobson 2007; McArthur 2008 d). A parede da bexiga nas tartarugas aquáticas é pequena e fina ao contrário da parede das tartarugas terrestres (Jacobson 2007).

A bexiga parece ter um papel significativo na homeostase nas espécies terrestres uricotélicas e nas semiaquáticas amino-ureotélicas (Jorgensen 1998). Nas tartarugas

terrestres a bexiga é o local de maior armazenamento de fluidos e iões (potássio) durante os períodos de seca (Jacobson 2007).

Nos quelónios existe a hipótese da urina ureteral ser deslocada para diferentes vias de acordo com diferentes fatores, entre os quais o estado de hidratação do animal, a quantidade de água ingerida, as condições climatéricas e outros fatores. Neste sentido, os testes de função renal (gravidade específica da urina, os cálculos de *clearance*, etc.) não se aplicam na urina excretada, nem na urina da bexiga, sendo uma possibilidade a utilização de urina ureteral para o efeito (McArthur 2008 d). Existem três possibilidades de destino para a urina ureteral:

- 1) a urina ureteral entra no urodeu e passa para o coprodeu ou proctodeu sem passar pela bexiga; a urina é excretada com as fezes e pode ocorrer alguma reabsorção de fluido no intestino grosso e proctodeu;
- 2) a urina entra no urodeu e é direcionada para a bexiga, onde ocorre o equilíbrio de osmolaridade e eletrolítico; o ácido úrico pode precipitar no interior da bexiga (principalmente sob a forma de uratos de potássio) e é eliminado a partir da urina;
- 3) a urina ureteral entra no urodeu e é excretada diretamente sem alterações na sua composição (McArthur 2008 d).

Num estudo, Dantzler e Schmidt-Nielson (1966) descobriram que os quelónios semiaquáticos amino-ureotélicos (*Trachemys scripta*) não parecem equilibrar o fluido no interior da bexiga, resultando na manutenção de uma urina hipotónica (Dantzler and Schmidt - Nielson 1966). No entanto, nas tartarugas de água doce, ao longo da parede da bexiga, ocorre o transporte ativo dos iões sódio e cloro juntamente com a secreção de iões hidrogénio e reabsorção de iões de bicarbonato (Dantzler and Holmes 1974; Stetson 1989).

2.2.8. Sistema Cardiovascular

O coração dos quelónios situa-se do ponto vista frontal por cima do plastrão, na linha média e cranial ao fígado. Apresenta três cavidades: átrio direito, átrio esquerdo e um ventrículo dividido (McArthur 2008 e). As três veias cavas (veia pré-cava direita e esquerda e veia pós-cava) e a veia hepática entram no lado direito do coração a partir do seio venoso. A válvula sinoatrial limita a abertura do seio venoso para o átrio direito. O sangue não oxigenado vem dos tecidos e chega ao átrio direito. O sangue oxigenado que se origina dos pulmões chega ao átrio esquerdo do coração a partir das veias pulmonares

(direita e esquerda). O átrio direito e esquerdo encontram-se completamente separados, ambos apresentam o mesmo tamanho; no entanto, algumas espécies podem apresentar o direito maior do que o esquerdo (Jacobson 2007). Nos quelônios o átrio direito e o seio venoso apresentam uma parede fina (McArthur 2008 e). Todos os répteis possuem duas aortas: a direita e a esquerda. A aorta direita provém do lado esquerdo do coração e a aorta esquerda origina-se do lado direito (Jacobson 2007). A aorta sai do coração e curva-se no sentido dorsocaudal em torno do coração e os dois troncos arteriais, carótida e subclávia, percorrem uma pequena distância no sentido cranial dividindo-se no bordo caudal da glândula tiroide. Um timo de tamanho pequeno encontra-se entre a artéria carótida e subclávia em ambos os lados, direito e esquerdo (McArthur 2008 e). Os répteis são o primeiro grupo de vertebrados a ter um sistema arterial coronário bem desenvolvido. A aorta esquerda é mais pequena do que a direita e ambas se juntam atrás do coração para formar a aorta dorsal comum.

O coração dos répteis é composto pela camada interna que se designa por endocárdio, pela camada muscular e tecido conjuntivo que se designa por miocárdio e a camada externa que se designa por epicárdio (Jacobson 2007). O pericárdio envolve o coração e pode apresentar algum líquido, nos quelônios o ápex do coração encontra-se fixado ao pericárdio a partir do ligamento gubernáculo (Jacobson 2007; McArthur 2008 e).

Na base do coração observa-se uma continuidade das células do endocárdio para o endotélio dos grandes vasos (Jacobson 2007). O ventrículo é mais compacto do que nos mamíferos e aves, apresenta fibras musculares organizadas em direções diferentes e separadas por espaços, também apresenta trabéculas e cristas direcionadas para o lúmen (Jacobson 2007). O interior do ventrículo é dividido pelas cristas e trabéculas em três câmaras principais: *cavum pulmonale*, *cavum venosum* e *cavum arteriosum* (Farrel, Gamperl et al. 1998). O ventrículo apresenta pouco tecido conjuntivo, também apresenta uma camada externa do miocárdio compacta e uma camada interna esponjosa (Jacobson 2007).

Do ponto de vista anatómico, o coração do réptil apresenta uma série de padrões de circulação de sangue retornando ao coração a partir do sistema circulatório e pulmonar. Os padrões são: mistura completa, mistura parcial e nível elevado de separação entre o sangue oxigenado e não oxigenado. Os fatores como a temperatura, o

estado respiratório, a taxa respiratória e a resistência do circuito podem alterar o padrão de circulação do sangue no próprio animal (Jacobson 2007). Normalmente nos quelônios ocorre o *shunt* do lado direito para o esquerdo. Relativamente à circulação do sangue, apenas os répteis apresentam a capacidade de evitar os pulmões enquanto existe a perfusão da circulação sistêmica (Farrel, Gamperl et al. 1998).

O controlo do fluxo de sangue oxigenado e não oxigenado para os diferentes circuitos arteriais também é efetuado por uma série de pregas musculares (McArthur 2008 e).

O reflexo do mergulho representa uma característica fisiológica dos répteis em que surge a alteração na circulação sistêmica e pulmonar, os fatores que influenciam este mecanismo não se encontram bem definidos. No entanto, vários estudos têm sido realizados sobre o tema. Existem evidências que o fluxo de sangue do coração para dentro dos vasos pulmonares está sob algum controlo fisiológico (McArthur 2008 e). Segundo Crossley e outros autores (1998) que estudaram o reflexo de mergulho em tartarugas anestesiadas (*Trachemys scripta*) foi possível observar que a hipoxia provocou um aumento da resistência dos vasos sanguíneos pulmonares. Este efeito persistiu após a administração de atropina e vagotomia cervical, o que sugere, mas não prova que a resistência era induzida localmente (Crossley, Altmiras et al. 1998). O nível ácido/base pode também afetar a resistência vascular pulmonar.

Nos quelônios a divisão de sangue oxigenado e não oxigenado no interior do coração é limitada, alterações na resistência vascular parecem ter uma influência significativa sobre a perfusão dos órgãos, tais como os pulmões (McArthur 2008 e).

Também Diethelm e Mader (1999) observaram que os animais anestesiados com isoflurano recuperavam mais depressa quando aplicavam ventilação forçada com ar em vez de oxigénio, sugerindo que as tensões de oxigénio elevadas também alteram a circulação pulmonar nesses animais (Diethelm and Mader 1999).

2.2.9. Sistema Linfoide e Hematopoiético

Na maioria dos répteis os principais órgãos linfoides são o timo e o baço (Cooper, Klumpau et al. 1985; Sypek and Borysenko 1988). Nos quelônios da subordem *Cryptodira* o baço é comprido. Os répteis não apresentam linfonódulos, mas sim células linfoides aglomeradas em diferentes tecidos, principalmente no trato gastrointestinal, tal como nas outras espécies, nomeadamente os mamíferos. Também

podem apresentar em menor quantidade nos pulmões, fígado, bexiga, rim e pâncreas (Jacobson 2007).

A hematopoiese ocorre principalmente na medula óssea, no entanto observa-se uma hematopoiese extramedular significativa no fígado (regiões portal e subcapsular), baço e timo (Stacy, B. A. and Pessier, A. P. 2007). As linhas de células acidófilas (heterófilos e eosinófilos) são muitas vezes observadas em focos evidentes em áreas de hematopoiese extramedular e podem assemelhar-se a infiltrados inflamatórios heterofílicos. É necessário atenção para não confundir pequenos focos linfoides ou aglomerados de células hematopoiéticas em diferentes tecidos com um processo inflamatório (Stacy, B. A. and Pessier, A. P. 2007). A existência de outros fenómenos num processo inflamatório, tais como a lesão tecidual ou necrose tecidual, presença de uma resposta vascular e infiltração profunda nos tecidos podem distinguir a hematopoiese extramedular e um conjunto de células linfoides da inflamação (Jacobson 2007).

2.2.10. Sistema Reprodutor

Os quelônios são ovíparos e a maioria liberta ovos com uma casca dura e calcificada. A maturidade sexual nas espécies de vida selvagem pode tardar 15 anos a ser atingida, no entanto depende da taxa de crescimento e do tamanho. As fêmeas atingem a maturidade mais tarde que os machos (McArthur 2008 f).

As gónadas localizam-se na cavidade abdominal e na maioria das espécies situam-se próximos dos polos craniais dos rins (Jacobson 2007).

Sistema Reprodutor Masculino

As gónadas são simétricas e apresentam uma coloração branca, amarela, castanha ou preta. Os testículos apresentam uma forma oval ou alongada e são lisos (Jacobson 2007). Localizam-se no sentido cranioventral adjacentes diretamente aos rins retrocelómicos (McArthur 2008 f).

O tamanho dos testículos varia sazonalmente. Quando se encontram aumentados refletem a espermatogénese. Os testículos são envolvidos pela túnica albugínea e o seu interior é constituído pelos túbulos seminíferos contornados, juntamente com o interstício que contém fibroblastos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e células intersticiais. As células intersticiais variam em tamanho, número e forma, dependendo da fase do ciclo reprodutivo. Os túbulos seminíferos são constituídos pelo

epitélio seminífero que é composto por células Sertoli e células germinativas desenvolvidas. As células germinativas podem ser classificadas em três camadas de tipos de células diferentes: (1) espermatogónia (próximo da membrana basal), (2) espermatócitos por baixo dos espermatídes e (3) espermatídes e espermatozoides (localizadas no centro). A seguir aos túbulos seminíferos seguem-se os ductos eferentes que são constituídos por uma camada de células compactadas ou achatadas. A partir destes ductos o esperma entra nos ductulos epidídimos, seguindo para um ducto maior, designado por ducto epidídimo e finalmente termina no ducto eferente. Estas estruturas são constituídas por células ciliadas e não ciliadas e na parede dos vasos deferentes observa-se uma camada muscular. Alguns répteis apresentam os vasos deferentes juntos aos ureteres na abertura comum da cloaca. O esperma é conduzido pelos vasos deferentes até ao pénis dos quelónios. O pénis dos quelónios encontra-se na posição cranial em relação à abertura da cloaca (Jacobson 2007).

Sistema Reprodutor Feminino

O trato reprodutivo da fêmea é constituído por dois ovários que se encontram fixos a partir da membrana celómica dorsal e de um par de ductos reprodutivos (Jacobson 2007; McArthur 2008 f). A localização dos ovários é na zona média ou caudal da cavidade celómica (Jacobson 2007). Durante a ovulação, o óvulo é libertado para o oviduto, onde o albúmen, as membranas e a casca são adicionados. O oviduto entra no urodeu (McArthur 2008 f).

O ovário apresenta uma hierarquia de folículos que se encontram em diferentes estados de desenvolvimento e atresia. Esta apresentação depende do tipo de espécie e da fase do ciclo reprodutivo. Assim como na espermatogénese, o desenvolvimento folicular é influenciado pela estação do ano (Jacobson 2007).

O desenvolvimento folicular nos répteis é dividido na fase pré-vitelogénica e vitelogénica. A fase vitelogénica refere-se à acumulação de gema no interior do oócito desenvolvido, seguindo a síntese de precursores de gema no fígado. Do ponto de vista macroscópico, os folículos pré-vitelogénicos e vitelogénicos podem ser distinguidos pelo tamanho e cor. Os folículos pré-vitelogénicos são pequenos e brancos e tornam-se amarelos e grandes à medida que são recrutados para a fase de vitelogénese. No geral, em muitas espécies os ovários apresentam-se quiescentes a maior parte do ano e normalmente são folículos pequenos e pré-vitelogénicos (Jacobson 2007).

Os folículos primordiais são constituídos por um núcleo, ooplasma e uma simples camada de células epiteliais foliculares escamosa. Os folículos pré-vitelogénicos não têm gema ao contrário dos folículos vitelogénicos que apresentam umas plaquetas de gema (Jacobson 2007).

Os folículos ovulam ou tornam-se atresícos. Posteriormente, à ovulação o corpo lúteo é formado e persiste ao longo da gestação. Nos quelónios, no início da formação do corpo lúteo existe uma cavidade luteal central que é constituída por células granulosas proliferativas que eventualmente preenchem esta cavidade. Depois da ovipostura, o corpo lúteo regride e torna-se um *corpus albicans* que pode persistir durante meses ou anos. O *corpus albicans* é uma estrutura de cicatrização que é tipicamente constituído por um estroma abundante e podem conter células pigmentadas (Jacobson 2007).

Em qualquer fase de desenvolvimento dos folículos, estes podem tornar-se atresícos mesmo na fase final da vitelogénese. Quando os folículos vitelogénicos se encontram atresícos a granulosa torna-se hipertrófica, hiperplásica e apresenta-se com vários vacúolos à medida que as células granulosas fagocitam a gema. Os histiócitos e outros leucócitos também podem infiltrar-se no folículo e participar na absorção da gema (Jacobson 2007). A frequência de atresia folicular varia com a espécie e época, podendo ser frequentes ou raras (Guraya 1989).

O oviduto (útero) origina-se desde da região adjacente ao ovário até à cloaca. A parede do oviduto é constituída por duas camadas de músculo liso que são envolvidos por uma serosa exterior. As cinco regiões do oviduto dos répteis são: o infundíbulo, o tubo uterino, o istmo (porção aglandular), o útero e a vagina (região muscular grossa) (Girling, J. E. 2002).

Os ovidutos são constituídos por células mucosas ciliadas e não ciliadas com várias glândulas localizadas principalmente por baixo do epitélio na região do tubo uterino/útero. Estas glândulas produzem componentes fibróticos, cálcio da casca e a membrana da casca. Nos quelónios pensa-se que estas glândulas produzem o albúmen. O desenvolvimento destas glândulas varia de acordo com a fase do ciclo reprodutivo da fêmea. Na transição do útero para a vagina observam-se células cuboides ciliadas não existem glândulas na submucosa. A vagina abre para a cloaca a partir de uma abertura separada do trato urinário (Jacobson 2007).

A fertilização é interna em todos os répteis e acontece próximo da porção final do oviduto cranial. Em alguns estudos tem-se demonstrado em várias espécies a presença de recetáculos seminais no trato reprodutivo da fêmea. Os recetáculos seminais encontram-se localizados na porção posterior do tubo uterino, istmo ou vagina anterior e proporcionam o armazenamento do esperma. É conhecido que alguns répteis conseguem armazenar o esperma por vários anos, produzindo ovos viáveis, mesmo não estando em contacto direto com o macho (Jacobson 2007).

Dimorfismo Sexual

As espécies neste estudo apresentam dimorfismo sexual, caracterizado por algumas características morfológicas específicas de cada género na fase adulta.

As fêmeas *Mauremys leprosa*, *Trachemys scripta* e *Pseudemys gorzugi* normalmente são maiores do que os machos. As fêmeas *Graptemys pseudogeographica* são, em média, 1,5-1,74 vezes maiores em relação ao macho (Gibbons and Lovich 1990). A fêmea *Pseudemys nelsoni* é um pouco maior do que o macho (Jackson, D. R. 1988).

Os machos das espécies em estudo apresentam uma cauda comprida com uma base larga e com a abertura da cloaca distal em relação à margem da carapaça. Ao contrário da fêmea, que apresenta uma cauda curta com uma abertura cloacal por baixo da margem da carapaça (Ernst, C. H. et al. 1996)

As fêmeas *Mauremys leprosa* e a *Graptemys pseudogeographica* apresentam a cabeça mais larga do que o macho (Gibbons and Lovich 1990; Ernst, C. H. et al. 1996).

Relativamente ao plastrão, observa-se que o macho *Mauremys leprosa* e *Emys orbicularis* apresentam-no côncavo, enquanto a fêmea apresenta-o plano ou convexo (Fritz and Günther 1996).

A maioria dos machos pode apresentar garras compridas e curvas (*Emys orbicularis*, algumas espécies do género *Trachemys*, *Pseudemys gorzugi* e *Pseudemys concinna*) ou finas (*Pseudemys nelsoni* e *Pseudemys gorzugi*), principalmente as garras dos membros anteriores. No entanto, as fêmeas apresentam garras curtas. O macho *Graptemys pseudogeographica* apresenta garras compridas curvas, principalmente a terceira garra.

Os machos *Trachemys scripta* ao longo da vida adquirem uma pigmentação preta e uniforme na pele, sendo este fenómeno designado por melanismo. Portanto, tornam-se mais escuros com a idade (Lovich, Garsta et al. 1990; Tucker, Maher et al. 1995). O melanismo na *Pseudemys nelsoni* pode ocorrer nos animais mais velhos, em ambos os sexos.

3. ESPÉCIES AUTÓCTONES

Em Portugal encontram-se documentadas duas espécies autóctones de tartarugas de água doce: a *Mauremys leprosa* e a *Emys orbicularis*.

Cágado-mediterrânico (*Mauremys leprosa*, Schweigger, 1812)

O estatuto de conservação da espécie do ponto de vista global encontra-se não catalogado (Nature 2012) e a nível nacional classificam-no como pouco preocupante (Cabral, Almeida et al. 2005). A *Mauremys leprosa* apresenta proteção legal segundo o Decreto-Lei nº 140/99 de 24 de abril, com a redação que lhe é dada pelo Decreto-Lei nº 49/05 de 24 de fevereiro, anexos B-II e B-IV, transposição da Diretiva Habitats (92/43/CEE), de 21 de maio de 1992, Anexos II e IV, assim como segundo o Decreto-Lei nº 316/89, de 22 de setembro, transposição da Convenção de Berna, Anexo II.

Identificação

Numa perspetiva da Fenologia caracteriza-se por ser uma espécie residente e autóctone em Portugal. É um cágado semiaquático da região ocidental mediterrânica de maiores dimensões (até 21 cm de comprimento de carapaça), a coloração da carapaça e da pele é castanha-esverdeada, com linhas alaranjadas no pescoço e membros. Apresenta uma carapaça oval e baixa, com uma quilha medial pouco proeminente (mais evidente nos juvenis do que nos adultos) e tem um bordo marginal posterior pouco serrado. Os escudos cervicais e vertebrais são mais largos do que compridos e o plastrão apresenta uma coloração amarela e uma chanfradura na extremidade caudal (Ernst and Barbour 1997).

Distribuição geográfica

De um modo global a *Mauremys leprosa* encontra-se distribuída pela Península Ibérica, assim como nalguns locais do Sul de França, Líbia, Tunísia, Argélia, Marrocos, Senegal, Benim e Niger (Araújo, Segurado et al. 1997; Segurado 2000; Da Silva 2002).

A nível europeu este cágado encontra-se distribuído na região biogeográfica Atlântica (Espanha) e na região biogeográfica Mediterrânica (Espanha, França e Portugal), no entanto é na Península Ibérica que se encontram as maiores populações desta espécie a nível mundial (Da Silva 2002).

Dentro da área de distribuição da espécie, segundo o último estudo de Segurado (2000), os locais de maior índice populacional são as regiões do Alentejo, Algarve, Beira Interior e Nordeste Transmontano (Segurado 2000).

Habitat

O cágado-mediterrânico (*Mauremys leprosa*) pode ser encontrado numa grande variedade de habitats aquáticos, dulçaquícolas, de baixa salinidade, de águas paradas ou de corrente lenta, permanentes ou temporárias, como charcos, pauis, represas, albufeiras, ribeiras e rios (Araújo, Segurado et al. 1997; Segurado 2000; Ferrand de Almeida, Ferrand de Almeida et al. 2001), dando preferência a locais com elevada cobertura de vegetação aquática, pouca profundidade e elevada insolação das margens. Esta espécie apresenta uma capacidade de tolerância em ambientes com índices de poluição elevados, no entanto quando o nível de poluição é excessivo tem tendência a desaparecer (Segurado 2000; Da Silva 2002).

História natural

Os cágados-mediterrânicos são animais de elevada longevidade, podendo viver até aos 35 anos.

As cópulas desta espécie ocorrem frequentemente dentro de água, no entanto também podem acontecer em terra (Ernst and Barbour 1997; Ferrand de Almeida, Ferrand de Almeida et al. 2001).

No período de nidificação, a fêmea escava um fosso com aproximadamente 15 cm de profundidade em locais arenosos ou junto a raízes de árvores. Após a sua postura, o ninho é coberto (Ernst and Barbour 1997).

As crias, com cerca de 32 mm de comprimento de carapaça, são mais claras do que os adultos, apresentam uma quilha medial e duas laterais nos escudos pleurais (que desaparecem com a idade). As crias são extremamente tímidas, permanecem escondidas no fundo do lago, enquanto os adultos se encontram nos locais de repouso (lugares onde se expõem ao sol para concretizar a sua termorregulação), mantendo-se alerta ao mínimo distúrbio. Quando são manipulados podem morder, libertar água da bexiga ou emitir uma

secreção de mau odor a partir das suas glândulas inguinais (Ernst and Barbour 1997).

Os dados publicados sobre a alimentação desta espécie sugerem elevados níveis de vegetais, de invertebrados (Ernst and Barbour 1989; Ernst and Barbour 1997), assim como de peixes e anfíbios (larvas e adultos) (Ernst and Barbour 1997; Ferrand de Almeida, Ferrand de Almeida et al. 2001). Os adultos podem apresentar comportamentos de canibalismo e ingerem os alimentos dentro ou fora da água (Ernst and Barbour 1997).

As populações residentes em zonas frias hibernam, principalmente no inverno. Nas regiões quentes mantêm-se ativas durante toda a estação, no entanto, em épocas de maior calor podem entrar numa fase de estivação e enterram-se (Ernst and Barbour 1997; Ferrand de Almeida, Ferrand de Almeida et al. 2001).

Cágado-de-carapaça-estriada (*Emys orbicularis*, Linnaeus, 1758)

O estatuto de conservação da espécie do ponto de vista global encontra-se em baixo risco (Nature 2012) e a nível nacional situa-se em risco (Cabral, Almeida et al. 2005). A *Emys orbicularis* apresenta uma proteção legal segundo os decretos-lei descritos anteriormente na espécie *Mauremys leprosa*.

Identificação

O cágado-de-carapaça-estriada é pequeno (até 16 cm de comprimento de carapaça), apresenta uma coloração preta com riscas e manchas amarelas na carapaça, na cabeça, membros e cauda. Apresenta uma carapaça oval, ligeiramente plana, cuja altura máxima encontra-se localizada posteriormente ao escudo vertebral médio, não apresenta margem posterior serrada, nem quilha medial, sendo esta evidente nas crias (a quilha desaparece com o crescimento das mesmas). Para além da quilha medial, as crias ainda apresentam um par de quilhas laterais pouco proeminentes (Ernst, C. H. et al. 1996).

Os escudos vertebrais são mais largos do que compridos, sendo o quinto escudo o mais largo. O plastrão é largo e apresenta uma zona flexível entre os escudos peitorais e abdominais, nas crias esta zona é mais flexível. Os escudos axilares e inguinais não se encontram presentes no plastrão, no entanto no caso de existirem são pequenos e pouco desenvolvidos (Ernst and Barbour 1997).

O lábio superior apresenta um bico córneo medial. A coloração da íris nos machos varia conforme a região geográfica, pode ser vermelha, castanha-amarelada, amarela ou branca. Relativamente às fêmeas, a íris é geralmente amarela e ocasionalmente branca (Ernst

and Barbour 1997).

Distribuição geográfica

O cágado-de-carapaça-estriada ocupa uma grande área de distribuição desde o Noroeste de África, de Marrocos à Tunísia, o Centro e Sul da Europa, da Península Ibérica à região do Mar Cáspio, a região ocidental da Ásia, do Noroeste de Irão e Iraque ao Norte da Síria (Ernst and Barbour 1997).

A nível europeu o cágado encontra-se distribuído na região biogeográfica Atlântica (Espanha, França e Portugal), na região biogeográfica Mediterrânica (Grécia, Espanha, França, Itália e Portugal), na região biogeográfica Continental (Alemanha, França, Itália e Áustria) e na região biogeográfica Alpina (Itália).

Quanto à distribuição nacional, verificou-se que as populações de *Emys orbicularis* se encontram dispersas e que a maioria dos casos observados incidiu em indivíduos isolados ou em pequenas populações (Araújo, Segurado et al. 1997; Ferrand de Almeida, Ferrand de Almeida et al. 2001).

Em Portugal, suspeita-se que a espécie tenha sofrido um declínio contínuo durante os últimos 100 anos – não só dos seus efetivos populacionais, mas também da área de ocupação, estimada em menos de 500 km² – apresentando um elevado grau de fragmentação (Araújo, Segurado et al. 1997; Oliveira, Brito et al. 2005). Atualmente, as populações com maior número de indivíduos não deverão ultrapassar os 1500 (Araújo, Segurado et al. 1997; Segurado 2000). Segundo o estudo de Segurado (2000) a probabilidade de ocorrência de *Emys orbicularis* incide nas zonas de planície alentejana e costa algarvia (Segurado 2000). As bacias hidrográficas de maior importância para espécie são as do rio Guadiana, entre o rio Mira e o Arade e entre o rio Arade e Guadiana (Araújo, Segurado et al. 1997; Ferrand de Almeida, Ferrand de Almeida et al. 2001; Oliveira, Brito et al. 2005).

Habitat

Segundo Segurado (2000), a espécie é mais frequente em locais onde se verificam maiores densidades de *Mauremys leprosa*, o que significa que as exigências ecológicas das duas espécies ao nível do habitat são muito semelhantes (Segurado 2000). No estudo desenvolvido por Segurado (2000), a espécie não foi encontrada em habitats de carácter lacustre, como por exemplo em albufeiras, surgindo com maior frequência em habitats palustres (Segurado 2000).

Relativamente à capacidade da *Emys orbicularis* suportar águas com índices de poluição elevados, segundo a bibliografia existem várias linhas de pensamento, no entanto ainda não há um consenso por parte dos autores.

História natural

A esperança de vida deste cágado é de 40-60 anos, chegando a atingir mais de 100 anos em cativeiro.

A cópula nesta espécie ocorre dentro de água. No período de nidificação, a fêmea escava um fosso afastado da água que cobre com terra, depois da postura.

As crias apresentam 20-25 mm de comprimento de carapaça, grandes cabeças, caudas longas e uma carapaça com uma quilha medial bem desenvolvida, assim como duas quilhas laterais pouco proeminentes (Ernst, C. H. et al. 1996).

O regime alimentar desta espécie é à base de invertebrados aquáticos e, com menos frequência, anfíbios (larvas e adultos) e pequenos peixes (Lanka and Vit 1985; Barbadillo 1987; Ferrand de Almeida, Ferrand de Almeida et al. 2001; Thienpont 2011-2015). Alguns autores referem ainda o consumo de material vegetal e insetos terrestres como fazendo parte da dieta diária desta espécie (Lebboroni and Chelazzi 1991; Keller 1997; Ferrand de Almeida, Ferrand de Almeida et al. 2001).

Apresentam hábitos de repouso e exposição solar, mas é uma espécie tímida que ao mínimo distúrbio mergulha para dentro de água. Estas tartarugas muitas vezes escondem-se, enterrando-se no fundo pouco profundo ou por baixo da vegetação flutuante (Ernst and Barbour 1997). Encontra-se ativa praticamente durante todo o ano, a partir dos 14 °C, podendo hibernar nas regiões frias. Pode também apresentar períodos de estivação nas regiões mais quentes (Araújo, Segurado et al. 1997; Ferrand de Almeida, Ferrand de Almeida et al. 2001) para escapar ao calor (Ernst and Barbour 1997).

4. ESPÉCIES EXÓTICAS PRESENTES NA FAUNA PORTUGUESA

Os principais fatores de ameaça das espécies autóctones, identificados em Portugal, estão estritamente relacionados com a alteração e destruição dos cursos de água, zonas palustres, capturas intencionais e introdução de espécies exóticas (ICNF 2000).

Para além dos fatores descritos anteriormente existem outros na história natural destas duas espécies autóctones que contribuem para a diminuição da taxa de

crescimento populacional. A tabela 5 representa algumas das características da história natural de cada espécie deste estudo, no entanto não se encontra totalmente preenchida por falta de dados. Na referida tabela, a maturidade sexual das fêmeas *Mauremys leprosa* e *Emys orbicularis* é considerada tardia, contribuindo para uma reduzida taxa de crescimento da população (Da Silva 2002).

No caso da *Emys orbicularis* foram efetuados estudos em Portugal, nos quais se demonstrou uma taxa de fecundidade reduzida e a quase inexistência de juvenis e recém-nascidos (mortalidade infantil elevada) (Segurado 1996; Araújo, Segurado et al. 1997; Segurado 2000). Segundo os dados de Thienpont (2011), é referida como sendo de 1 para 100 a probabilidade de um jovem *Emys orbicularis* atingir a idade adulta (Thienpont, S. 2011 – 2015). Assim sendo, considera-se particularmente esta espécie a mais frágil com uma incapacidade de recuperação de impactos negativos (ICNF 2000).

Conforme explicitado na tabela 5, as espécies exóticas comparativamente com as autóctones possuem geralmente uma taxa de crescimento mais elevada, atingem a maturidade sexual mais cedo, apresentam um número elevado de posturas e cada postura pode conter muitos ovos. Estas espécies demonstram ter um comportamento mais agressivo e oportunista do que as espécies autóctones. A sua introdução na natureza pode originar alterações na cadeia alimentar, assim como contribuir para o aparecimento e a introdução de doenças ou parasitas para as quais as espécies autóctones não possuem defesas. Relativamente a este último tema, existem poucos estudos que descrevam a influência do estado sanitário das espécies exóticas sobre as tartarugas autóctones. Quanto aos agentes patogénicos que afetam mais os quelónios, de acordo com a bibliografia, no campo da virologia da família Viridae situa-se os *Herpesvirus* (Origgi and Jacobson 2000; Stacy, Wellehan et al. 2008) e a nível da parasitologia encontra-se descrito a presença de helmintes (*Serpinema microcephalus*, *Aplectana* sp., *Falcastrua* sp., *Spiroxys*, *Spironoura* e *Capillariidae* (Crespo, Ayres et al. 2002; Hidalgo-Vila, Martínez-Silvestre et al. 2004), de várias espécies de *Eimeria* (Segade, Crespo et al. 2006) e de ectoparasitas da família Placobdella (Ayres and Alvarez 2008). Do ponto de vista bacteriológico, encontra-se descrito a *Salmonella* (Mallaret, Turquand et al. 1990; Hidalgo-Vila, Díaz-Paniagua et al. 2009) como a bactéria que afeta mais as tartarugas, no entanto na discussão deste trabalho estão enumerados os agentes bacterianos patogénicos.

Em Portugal, as tartarugas exóticas encontradas no ambiente têm sido a tartaruga-da-Flórida, a tartaruga-hieroglífica e a tartaruga-corcunda-do-Mississípi. A maioria destas tartarugas vem dos Estados Unidos da América.

Tabela 5 – Características da história natural de cada espécie do estudo. Adaptado de Ernst, C. H. et al. (1996) e de ICNF (2000).

Espécie	Maturidade sexual (idade)		Época de reprodução	Época de nidificação	Época de postura	Período de incubação
	M	F				
<i>Mauremys leprosa</i>	2 – 4 anos	6 – 10 anos	Março Abril	Maio julho	junho-julho 1 a 13 ovos	25 a 65/75 dias
<i>Emys orbicularis</i>	4 – 10 anos	6 – 12 anos	Março Maio	Primavera	primavera (até ao final de junho) 3 a 16 ovos	Verão
<i>Trachemys scripta</i>	2 – 5 anos	5 – 8 anos	primavera e outono	Abril Julho	5 ou 6 posturas por ano (intervalo entre as posturas é de 12 a 36 dias) 2 – 30 ovos	60 a 91 dias
<i>Gratemys pseudogeographica</i>	4 – 6 anos	8 anos	Abril Maio	Junho Julho	2 a 3 posturas por ano 8 – 22 ovos	52 a 85 dias
<i>Pseudemys nelsoni</i>	3 – 4 anos	5 – 7 anos	Anual	Anual	3 a 6 posturas por ano 6 – 31 ovos	60 a 75 dias
<i>Pseudemys concinna</i>	–	–	primavera e início do verão	Maio Junho	4 posturas por ano (intervalo entre as posturas é de 21 dias) 9 – 20 ovos	70 a 90 dias

***Trachemys scripta* (Schoepff, 1792)**

Identificação

A *Trachemys scripta* é uma tartaruga de tamanho médio ou grande (20 a 60 cm de comprimento de carapaça) (Ernst and Barbour 1997). Esta espécie pode pesar até aos 2,5 Kg e viver durante 40 ou 50 anos.

A carapaça é oval, apresenta uma quilha medial pouco proeminente e uma extremidade posterior da carapaça pouco serrada (Ernst and Barbour 1997).

A coloração da carapaça pode ser verde azeitona ou castanho, pode ter marcas amarelas, mas variam desde barras a tiras ou forma reticulada (na forma de teia de aranha) ou *ocelli* (semelhante a um olho, zona escura circular rodeada por uma zona mais clara). O plastrão é pouco flexível e tem uma coloração amarela com diferentes padrões de manchas pretas. Apresenta um nariz pontiagudo, proeminente e um bico córneo medial no lábio superior (Ernst and Barbour 1997).

A coloração da pele é verde ou castanho-esverdeado com linhas amarelas. A linha pós-orbital é larga e pode ser vermelha, laranja ou amarela, conforme o tipo de subespécie, parecendo uma bochecha colorida. O pescoço apresenta na face ventral uma linha central larga em forma de Y.

Atualmente encontram-se três subespécies identificadas, classificadas e descritas. As subespécies são a *Trachemys scripta scripta*, *Trachemys scripta troosti* e a *Trachemys scripta elegans*.

Habitat

As *Trachemys scripta* encontram-se em zonas fluviais, com águas calmas, de pouca corrente e com pouca profundidade, normalmente estes locais apresentam zonas de repouso e muita vegetação aquática (Ernst, C. H. et al. 1996).

As crias no norte de América apresentam 25,4-35,8 mm de comprimento de carapaça e as crias da América central 36-41,8 mm de comprimento. As carapaças são verdes com marcas amarelas, nos escudos marginais apresentam borões ou *ocelli* e na ponte e no plastrão possuem um padrão muito claro (Moll, D. 1994).

Os juvenis são carnívoros e os adultos omnívoros (não exibem preferência óbvia por alimento animal ou vegetal). A alimentação destas tartarugas pode ser: algas, moluscos, artrópodes, insetos, peixes, anfíbios, pequenos répteis e aves aquáticas. As tartarugas também se alimentam dos detritos existentes no fundo do lago (carne, peixe, plantas em putrefação) (Ernst, C. H. et al. 1996; Parmenter, R. R. et al. 1990).

Tartaruga-corcunda-do-Mississípi (*Graptemys pseugeographica*, Gray, 1831)

Identificação

A tartaruga-corcunda-do-Mississípi é considerada uma espécie de tartaruga grande de água doce. A fêmea pode atingir 27 cm de comprimento de carapaça e o macho 15 cm de comprimento de carapaça (Ernst and Barbour 1997).

Apresentam uma carapaça côncava, uma quilha medial proeminente com espinhos e uns escudos posteriores serrados. A coloração da carapaça é verde acastanhado ou castanho claro com marcas ovais amarelas. O plastrão dos adultos tem uma coloração creme ou amarela, enquanto os juvenis apresentam um padrão de linhas escuras contornando as suturas dos escudos. Esta espécie não apresenta um nariz proeminente e um bico córneo no lábio superior (Ernst and Barbour 1997).

A coloração da pele é verde acastanhado ou castanho com muitas linhas amarelas estreitas nos membros posteriores, cauda, queixo e pescoço. Observa-se uma pequena marca pós-orbital ou uma linha que se prolonga pelo pescoço (Ernst, C. H. et al. 1996).

Atualmente, encontram-se duas subespécies identificadas: a *Graptemys pseudogeographica pseudogeographica* e a *Graptemys pseudogeographica kohnii* (Vogt 1980).

Habitat

A *Graptemys pseudogeographica* vive em grandes rios e em águas com pouca corrente, mas também ocupa lagos, lagoas, charcos, baías, valas e pântanos. Preferem águas com muita vegetação aquática e com lugares de repouso, onde se expõem ao sol. Também são encontradas nos principais canais dos grandes rios com correntes fortes. Parece que evitam o substrato de areia e preferem fundos de lodo e lama (Fuselier and Edds 1994).

História natural

As crias são coloridas, claras e brilhantes, têm uma carapaça com uma quilha proeminente e apresentam aproximadamente 25-37 mm de comprimento de carapaça (Ernst and Barbour 1997).

A alimentação desta espécie omnívora é à base de moluscos (bivalves e caracóis), lagostins, insetos, peixe em putrefação e matéria vegetal (Ernst and Barbour 1997).

Tartaruga-de-barriga-vermelha-da-Flórida (*Pseudemys nelsoni*, Carr, 1938)

Identificação

A carapaça desta espécie é alongada, pode ter 34 cm de comprimento e apresenta uma extremidade posterior da carapaça pouco serrada (Ernst and Barbour 1997).

A coloração da carapaça normalmente é preta com marcas amarelas ou vermelhas nos escudos pleurais e marginais. Observa-se a partir do segundo escudo pleural linhas curvas no sentido dorso-ventral, algumas em forma de Y com uma coloração vermelha. O plastrão tem uma coloração laranja avermelhada e pode

apresentar um padrão escuro medial que desaparece com a idade ou não (Ernst and Barbour 1997).

A cabeça não apresenta um nariz proeminente e tem dois bicos córneos no lábio superior. A coloração da pele é preta com linhas amarelas (Ernst, C. H. et al. 1996).

Habitat

Esta espécie vive em lagoas, lagos, valas, charcos, pântanos, riachos limitados e rios com pouca corrente. Normalmente são águas com muita vegetação aquática (Ernst and Barbour 1997).

História natural

As crias têm uma coloração mais clara do que os adultos, apresentam uma carapaça redonda de 28-32 mm de comprimento e uma quilha pouco proeminente. A coloração do plastrão é laranja ou vermelha e apresenta marcas escuras (Ernst and Barbour 1997).

A *Pseudemys nelsoni* juvenil é carnívora e a sua alimentação é à base de insetos aquáticos e outros pequenos invertebrados. Os adultos são herbívoros e procuram a partir da escavação do fundo do rio, detritos em decomposição (plantas e peixe em decomposição) (Ernst, Lovich et al. 1994; Bjorndal, Bolten et al. 1997).

Tartaruga-do-grande-rio-Cooter (*Pseudemys gorzugi*, Ward, 1984)

Identificação

Os adultos desta espécie podem chegar aos 23,5 cm de comprimento da carapaça. A carapaça é oval e comprida, a nível dorsal é plana e apresenta uma quilha medial pouco proeminente, os escudos do bordo caudal são serrados. A coloração da carapaça é castanha esverdeada e em cada escudo apresenta um padrão de manchas amarelas com anéis pretos (Ernst and Barbour 1997).

O plastrão é estreito, apresenta uma chanfradura anal e não é flexível. A coloração do plastrão é amarela com suturas pretas nos juvenis, mas estes bordos escuros desaparecem com a maturidade, deixando apenas os bordos pretos nas suturas gular-úmeral e úmero-peitoral nos adultos (Ernst and Barbour 1997).

O lábio superior é liso e a coloração da pele é verde com linhas amarelas na cabeça, pescoço, membros e cauda. A mancha oval pós-orbital tem os bordos escuros com *ocelli* amarelos no centro. Observa-se uma linha em forma de Y no queixo.

Habitat

Esta espécie costuma viver em rios ou ribeiras (Degenhardt, Painter et al. 1996) com pouca profundidade e lodo (Degenhardt and Christiansen 1974).

História natural

As crias apresentam em média 33,9 mm de comprimento de carapaça. Algumas das crias no Novo México hibernam no ninho durante o inverno (Degenhardt, Painter et al. 1996).

A alimentação da *Pseudemys gorzugi*, de acordo com os exames coprológicos, baseia-se em algas verdes, peixe e caranguejo (Degenhardt, Painter et al. 1996). As crias de cativeiro comem peixe morto, caranguejo, alface, espinafres e partes de várias plantas aquáticas selvagens (Ernst and Barbour 1997).

Tartaruga-hieroglífica (*Pseudemys concinna*, LeConte, 1830)

Identificação

A *Pseudemys concinna* é considerada uma tartaruga de água doce grande, onde os machos podem atingir os 30 cm de comprimento de carapaça e as fêmeas os 43 cm (Ward & Jackson, 2008). Apresentam uma carapaça oval, comprida, com os lados direitos ou curvos e uns escudos marginais posteriores ligeiramente serrados. Observam-se algumas rugosidades longitudinais nos lados da carapaça e a ausência de quilha (Ernst and Barbour 1997). A coloração da carapaça difere, pode ser verde, verde-acastanhado, castanho-escuro ou preto, também apresenta um padrão de marcas claras (bandas transversais finas ou reticulações). O plastrão não é flexível, tem uma chanfradura posterior e é amarelo ou laranja com marcas escuras difusas. A cabeça apresenta um nariz ligeiramente proeminente e um lábio superior sem bico córneo (existem algumas populações que apresentam pequenos bicos córneos) (Ernst and Barbour 1997).

A coloração da pele é verde-acastanhado, castanho ou preto com várias linhas longitudinais amarelas (Ernst and Barbour 1997).

Os machos mais velhos tornam-se parcialmente mais escuros (melanismo) com marcas escuras na cabeça, membros e carapaça, do tipo vermiculações castanhas escuras ou pretas (Ernst and Barbour 1997).

Quanto à nomenclatura de subespécies da *Pseudemys concinna*, atualmente não existe um consenso entre os autores. Alguns consideram a existência de três subespécies (Seidel and Dreslik 1996): *Pseudemys concinna concinna* (LeConte, 1830), *Pseudemys concinna floridana* ou *Pseudemys floridana floridana* (LeConte, 1830) e a *Pseudemys concinna suwanniensis* (Carr, 1937) ou *Pseudemys floridana suwanniensis* (Dijk et al, 2012). Outros autores referem apenas duas subespécies (Fahey, 1980; Fritz & Havas, 2007).

Habitat

Esta espécie habita grandes rios, mas também pode ser encontrada em lagos, lagoas, ribeiras, pântanos e canais.

História natural

As crias apresentam carapaças redondas, verdes com um padrão de marcas mais evidente do que nos adultos. Apresentam também uma quilha medial e têm cerca de 27 a 36,5 mm de comprimento de carapaça (Ernst and Barbour 1997).

As tartarugas juvenis são carnívoras, mas tornam-se exclusivamente herbívoras na fase adulta. A alimentação desta espécie pode ser: algas (*Cladophora*), plantas vasculares (*Ceratophyllum*, *Egeria*, *Sagittaria*, *Vallisneria*), caracóis (*Amnicola*, *Eimia*, *Hydrilla*, *Leptodictyum*, *Najas*, *Nassarius*, *Olivella*) e peixe (*Opsanus*) (Lagueux, Bjorndal et al. 1995; Bjorndal, Bolten et al. 1997). Num estudo sobre a alimentação desta espécie 80 a 100% das *Pseudemys concinna suwanniensis* capturadas numa primavera na Flórida ingeriram *Ceratophyllum* e *Egeria* (Lagueux, Bjorndal et al. 1995).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

A concretização do seguinte trabalho foi fundamentalmente baseada numa estrutura de carácter descritivo, focando-se principalmente nas alterações do ponto vista macroscópico e microscópico dos órgãos das tartarugas exóticas, durante a realização da necrópsia. Partindo dessas alterações, baseando-se na pesquisa bibliográfica, procurou-se a origem dessas patologias (etiologia microbiana, vírica ou parasitária), a epidemiologia, os sinais clínicos e o diagnóstico.

A zona de estudo incluiu tartarugas oriundas do Projeto *Life Trachemys* e de particulares.

A partir de 2011, as tartarugas exóticas presentes na Lagoa de São Lourenço, na Lagoa do Garrão, na Lagoa das Dunas Douradas e no Caniçal de Vilamoura foram capturadas e encaminhadas para dois centros de recuperação de animais selvagens: o centro do PBG e o centro RIAS da Ria Formosa (Olhão). A maioria dos particulares que cederam as suas tartarugas exóticas ao PBG tinha origem nos distritos Vila Nova de Gaia e Porto.

Seleção e recolha da amostra

De acordo com o contexto anterior, realizaram-se as necrópsias de tartarugas ingressadas no PBG, que tiveram uma morte por causas naturais ou foram eutanasiadas devido a doença.

A eutanásia foi executada com recurso a duas técnicas de administração: via intracelómica e via seio venoso cervical. A dose aplicada foi de 200 mg/Kg peso vivo de pentobarbital sódico (Eutasil®) (McArthur 2008 g).

Posteriormente à morte do animal teve-se o cuidado de realizar imediatamente a necrópsia, não ultrapassando o intervalo de seis horas após a morte.

Nos casos em que não foi possível executar a necrópsia após a morte do animal, os cadáveres foram conservados imediatamente a uma temperatura de refrigeração (temperatura ideal 1 a 5 °C). No entanto, no início deste estudo, existiam já alguns casos de cadáveres que haviam sido congelados.

Neste trabalho criou-se uma ficha de necrópsia, representada na figura 1, com intuito de registar toda a informação obtida durante a realização da mesma.

A avaliação da idade foi sistematizada da seguinte forma:

- Cria: apresentava comprimento da carapaça pequeno, esta encontrava-se pouco calcificada e durante a necrópsia observaram-se as gónadas pouco desenvolvidas ou ausentes.
- Jovem: O comprimento da carapaça não atingiu o tamanho de maturidade sexual e durante a necrópsia observaram-se gónadas pouco desenvolvidas.
- Adulto: Observou-se dimorfismo sexual, o comprimento da carapaça atingiu o tamanho de maturidade sexual e durante a necrópsia observaram-se gónadas bem desenvolvidas.

O cadáver foi avaliado em relação ao estado de conservação nas seguintes categorias:

- Fresco: órgãos com coloração normal e sem odor.

- Decomposição inicial: órgãos com pequenas alterações na coloração e presença ou não de mau odor.
- Decomposição total/putrefação: órgãos com alteração total da coloração, principalmente coloração acinzentada, apresentavam textura gelatinosa e um mau odor.
- Seco/Mumificado: A pele e os músculos apresentavam-se secos e os órgãos desidratados, por vezes mumificados.

A recolha dos dados biométricos fez-se segundo as seguintes categorias:

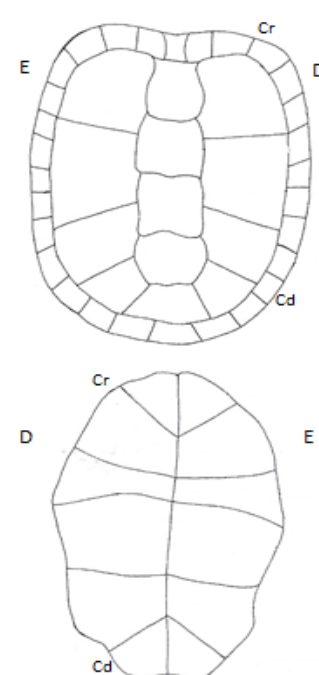
- Comprimento da carapaça (CC) – com o auxílio de uma régua realizou-se a medição desde do escudo nugal até ao escudo marginal da extremidade posterior da carapaça.
- Comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) – com o auxílio de uma fita métrica flexível realizou-se a medição desde do escudo nugal até ao escudo marginal da extremidade posterior da carapaça.
- Largura da carapaça (LC) – com o auxílio de uma régua realizou-se a medição da zona mais larga da carapaça, partindo do escudo marginal até ao outro escudo do lado oposto.
- Largura curvilínea da carapaça (LCC) – com o auxílio de uma fita métrica flexível realizou-se o mesmo procedimento de medição descrito anteriormente.
- Comprimento do plastrão (CP) – com o auxílio de uma régua realizou-se a medição desde da extremidade cranial dos escudos gulares até à extremidade caudal dos escudos anais.
- Largura do Plastrão (LP) – com o auxílio de uma régua realizou-se a medição da zona mais larga do plastrão, partindo da extremidade lateral do escudo até à extremidade lateral do lado oposto.
- Altura (Alt) – com o auxílio de uma régua realizou-se a medição do ponto mais alto da carapaça.
- Largura da cabeça (LCab) – com o auxílio de uma régua realizou-se a medição da zona mais larga da cabeça.
- Comprimento da cauda (CCd) – com o auxílio de uma régua realizou-se a medição desde da junção da cauda ao corpo até à ponta da cauda.

- Comprimento cloacal (ccl) – com o auxílio de uma régua realizou-se a medição desde a abertura da cloaca até à ponta da cauda.

A avaliação da condição corporal foi sistematizada nas seguintes categorias:

- Caquexia – o animal apresentava um peso diminuído, ausência de massa muscular, de tecido gordo e aumento do espaço intracelómico.
- Emaciação/Muito magro – o animal apresentava diminuição da massa muscular e ausência de tecido gordo.
- Magro – o animal apresentava pouca massa muscular.
- Normal – o animal apresentava peso dentro dos parâmetros fisiológicos, massa muscular desenvolvida e no interior da cavidade celómica presença de alguns depósitos de tecido gordo.
- Gordo – o animal apresentava peso excessivo, aumento da massa muscular e acumulação excessiva de tecido gordo no interior da cavidade celómica, principalmente na zona da ponte da carapaça, onde existia uma camada espessa de tecido adiposo e também em torno dos órgãos.

FICHA DE NECRÓPSIA

Nº Ficha: _____		Nº Identificação: _____		Data de ingresso: _____		
Data da necrópsia ____/____/____		Data da morte ____/____/____				
Espécie: Nome comum _____			Nome Científico _____			
Idade: _____		Sexo M ☐ F ☐ Indeterminado ☐				
Local de origem do cadáver _____						
História Clínica		Animal cativo ☐		Animal silvestre ☐		
Exame Físico:						
EXAME MACROSCÓPICO DO CADÁVER						
Estado do cadáver:						
Fresco ☐ Decomposição inicial ☐ Decomposição total/Putrefação ☐ Seco/Mumificado ☐						
Biometrias	CC	CCC	LC	LCC	CP	LP
Peso (g)	Alt	Lcab	CCd	Ccl		
Estado Nutricional/Condição Corporal:						
Caquexia ☐ Emaciação/Muito Magro ☐ Magro ☐ Normal ☐ Gordo ☐						
PELE						
OLHOS/OUVIDOS						
MUCOSAS						
EXAME INTERNO						
SISTEMA MUSCULOSQUELÉTICO						
CAVIDADES CORPORAIS						
SISTEMA HEMOLINFÁTICO						
SISTEMA RESPIRATÓRIO						
SISTEMA CARDIOVASCULAR						
SISTEMA DIGESTIVO						
SISTEMA URINÁRIO						
SISTEMA REPRODUTIVO						
SISTEMA ENDÓCRINO						
SISTEMA NERVOSO						
DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO:						
ANÁLISES DE LABORATÓRIO: Coprologia ☐ Histopatologia ☐ Hematologia ☐						
FOTOS:						

Legenda: CC – comprimento da carapaça / CCC – comprimento curvilíneo da carapaça / LC – largura da carapaça / LCC – largura curvilínea da carapaça CP – comprimento do plastrão / LP – largura do plastrão / Alt – altura da carapaça / LCab – largura da cabeça / CCd – comprimento da cauda / Ccl – comprimento cloaca / D – lado direito / E – lado esquerdo / Cr – cranial / Cd – caudal

Figura 1 – Ficha de necrópsia criada e utilizada neste estudo.

O protocolo aplicado em cada necrópsia foi o seguinte:

- Em primeiro lugar, recolheram-se os dados sobre a anamnese do animal, por exemplo o peso e as biometrias;
- Realizou-se o exame externo, registando-se o estado de hidratação e condição corporal. Procedeu-se ao exame da condição muscular, do tegumento, da carapaça, da cavidade oral, dos olhos, dos ouvidos, das narinas e da abertura cloacal. Também se fez a palpação da carapaça para pesquisa de traumas, fraturas e outras anomalias;
- Seguidamente, efetuou-se o exame interno, onde a tartaruga foi colocada em decúbito dorsal. A partir do auxílio de uma serra elétrica fez-se o corte bilateral no plastrão ao nível das pontes da carapaça. Executou-se a incisão da pele à volta do plastrão com um bisturi e uma tesoura. Os músculos peitorais e pélvicos fixados no plastrão foram também dissecionados;
- Retirou-se o plastrão e completou-se a avaliação do grau de condição corporal;
- Realizou-se uma incisão no pericárdio e fez-se o exame macroscópico ao coração;
- Efetuou-se uma incisão na membrana celómica e avaliou-se a cavidade celómica;
- Após a avaliação macroscópica do fígado, este foi extraído com cuidado, dissecaram--se alguns dos tecidos conjuntivos ligados ao estômago;
- Colocou-se uma pinça hemostática na porção mais cranial do esófago e outra na porção mais distal do reto, retirando-se todo o trato gastrointestinal e órgãos associados (baço e pâncreas);
- Procedeu-se à remoção e exame da bexiga;
- Por último, após a extração do fígado e do trato gastrointestinal realizou-se a avaliação dos pulmões, rins, glândulas adrenais e gónadas.

Durante a necrópsia realizou-se o registo fotográfico e posteriormente as recolhas de amostras. Conforme a tabela 6, recolheram-se amostras de cinco órgãos principais: coração, fígado, baço, rins e pulmões. Dependendo do tamanho da tartaruga, alguns órgãos foram recolhidos inteiros, noutros casos retirou-se uma amostra de aproximadamente um centímetro de largura e comprimento. No entanto, no início deste estudo, nas primeiras necrópsias foram apenas recolhidas amostras de órgãos alterados macroscopicamente. As amostras foram colocadas em frascos com formol a 10% num ambiente escuro e fresco.

Tabela 6 – Recolha de amostras e tipo de análise aplicada.

Órgão	Zona de recolha	Tipo de análise
Coração	Inteiro	Histologia
Fígado	Bordo caudal	
Baço	Inteiro	
Rim	Inteiro	
Pulmão	Bordo caudal	

A análise histológica das amostras foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade de Évora.

Análise Laboratorial

No Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade de Évora, cada amostra foi acompanhada de uma ficha de entrada do próprio laboratório, onde foi feita a secção de pequenos fragmentos para uma cassete de plástico. Essas cassetes foram colocadas em formol a 10%.

O processamento dos tecidos foi realizado no aparelho *Histoquinette – Jung Histokinette* 2000. Conforme descrito na tabela 7, as amostras foram submetidas a diferentes reagentes durante períodos de tempo de imersão diferentes com o intuito de desidratar, clarificar/penetrar e infiltrar os tecidos.

Tabela 7 - Processamento de tecidos a partir do programa I automático do aparelho *Histoquinette – Jung Histokinette* 2000.

ESTAÇÕES	REAGENTE	TEMPO DE IMERSÃO Horas: Minutos
1	Álcool 70°	2:00
2	Álcool 90°	2:00
3	Álcool 90°	2:00
4	Álcool 90°	2:00
5	Álcool 100°	3:00
6	Álcool 100°	1:30
7	Álcool 100°	1:00
8	Álcool 100°	2:00
9	Xilol	2:00
10	Xilol	2:00
11	Parafina	2:00
12	Parafina	2:00
Tempo Total de Processamento		23:30

No final do processamento dos tecidos e após a inclusão com parafina, realizou-se o corte dos tecidos com 3 µm de espessura e a montagem das lâminas.

Ao longo do trabalho laboratorial utilizaram-se algumas colorações, entre as quais a coloração de hematoxilina e eosina (H-E), a coloração de *Gram*, de *Grocott*, de Ácido periódico – Reagente de *Schiff* (PAS) e a coloração *Ziehl – Neelsen*.

A coloração de hematoxilina e eosina foi aplicada em todas as amostras com intuito de visualizar uma grande quantidade de diferentes estruturas tecidulares. A coloração diferencial *Gram* foi utilizada para diferenciar o tipo de bactérias presentes nos tecidos. A coloração *Ziehl – Neelsen* foi usada porque é o método de eleição para evidenciar as bactérias *Gram* negativas álcool-ácido resistentes (principalmente as bactérias de putrefação). E, finalmente a coloração diferencial *Grocott* e PAS foi aplicada nos casos de suspeita de presença de fungos nos tecidos. Numa das amostras de fígado recorreu-se ao procedimento de despigmentação com intuito de diferenciar a presença de melanina com hemossiderina.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 42 indivíduos analisados, 16 foram eutanasiados devido a doença e 26 morreram por causas naturais. O gráfico 3 representa a frequência relativa de eutanásias e de morte natural, observando-se maior percentagem de tartarugas que morreram por causas naturais (62%).

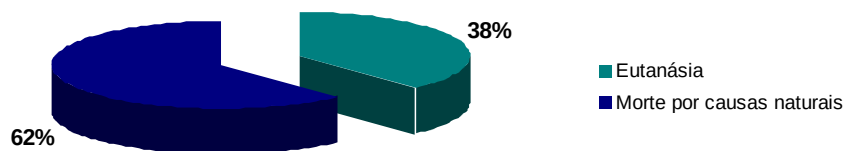


Gráfico 3 – Frequência relativa das causas de morte (n = 42).

O gráfico 4 representa a frequência relativa do tipo de técnica na aplicação do Eutasil®. Neste trabalho verificou-se que o seio venoso cervical foi difícil de aceder em tartarugas pequenas, sendo mais fácil o acesso por via intracelômica, justificando-se o elevado valor de percentagem de tartarugas eutanasiadas por via celômica (56%) observado no gráfico 4.

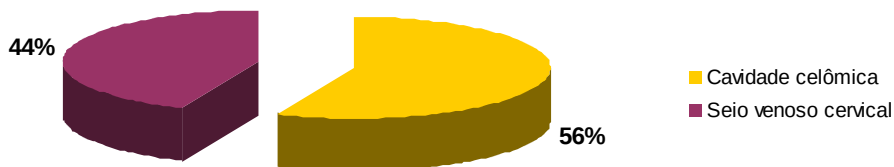


Gráfico 4 – Frequência relativa do tipo de técnica na aplicação de Eutasil® (n = 16).

Segundo o conceito de eutanásia definido como a indução da morte de um animal com o mínimo de sofrimento físico e mental, a aplicação da mesma pode-se realizar utilizando diferentes métodos, nomeadamente injeção letal intracardíaca, intracranial, intracelômica e via seio venoso cranial. Relativamente ao último método de eutanásia, durante a atividade prática, demonstrou ter algumas desvantagens, principalmente no que diz respeito à demora da morte do animal, provocando convulsões e supostamente sofrimento. Do ponto vista macroscópico, observou-se que o interior da cavidade celômica apresentava muito sangue coagulado o que dificultou a interpretação ao nível microscópico (órgãos muito congestionados).

No início deste estudo foram realizadas necrópsias de tartarugas que tinham sido anteriormente congeladas, no entanto, durante este trabalho houve um controlo mais rigoroso relativamente ao tipo de conservação de cadáveres, evitando a sua congelação. Nos casos onde não foi possível realizar as necrópsias no próprio dia da morte do animal encaminhou-se o mesmo para a refrigeração. Conforme explicitado no gráfico 5, realizou-se a divisão do número total de necrópsias ($n = 42$) pelo tipo de conservação de cada cadáver, resultando na frequência absoluta do mesmo. Observou-se que foram realizadas em maior número necrópsias em cadáveres refrigerados no prazo de um a quatro dias.

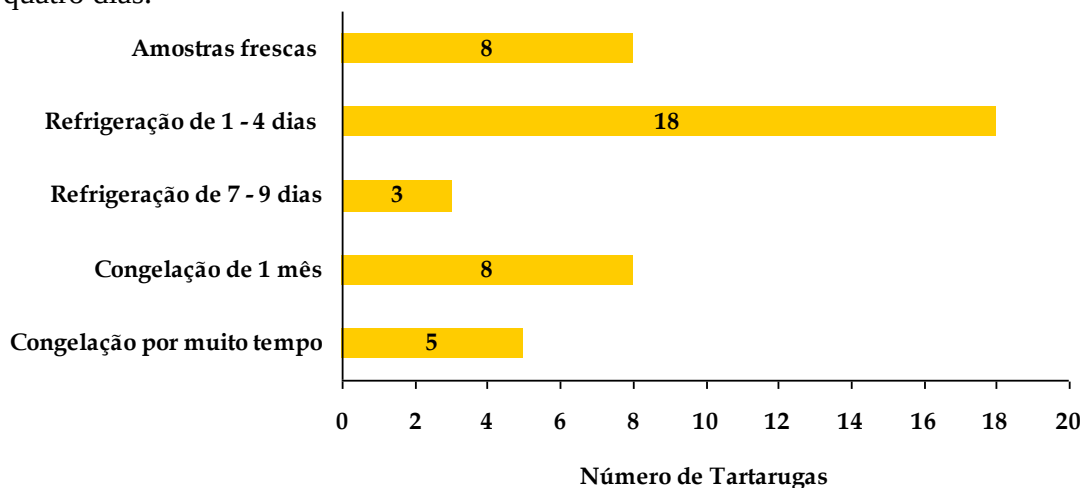


Gráfico 5 – Frequência absoluta do tipo de conservação de cadáveres ($n = 42$).

Relativamente ao tipo de conservação de cadáveres, encontra-se na literatura descrito que na impossibilidade de realizar uma necrópsia imediatamente após a morte do animal, com colheita de amostras para a histologia, o mesmo deve ser conservado em temperatura de refrigeração no prazo máximo de 72 horas e nunca ser congelado (Terrel

and Stacy 2007). Neste estudo, a nível microscópico, observou-se diferenças na qualidade do tipo de amostra tecidual. As amostras frescas e refrigeradas até quatro dias revelaram melhor qualidade do que as outras.

A necrópsia pode ser dividida em diferentes componentes de forma a tornar o processo sistemático e simples. Neste estudo, no que concerne ao exame externo não se teve o cuidado de realizar raspagens em lesões da pele, como por exemplo úlceras na carapaça ou zonas com hiperqueratose da pele. Quanto ao exame interno deveria ter sido mais sistemático e pormenorizado. Na execução de determinadas etapas das necrópsias houve pequenas lacunas que poderiam ter sido evitadas, tais como a não realização da incisão na área da mandíbula de forma a expor a língua, glote e porção proximal da traqueia, a fim de realizar o respetivo exame da cavidade oral e recolha dos tecidos necessários para a análise histológica. Outro procedimento em falta foi a não realização antecipada do exame e recolha da glândula tiroide, do timo e das glândulas paratiroides, relativamente aos restantes órgãos, facto que dificultou a identificação dos mesmos. Quanto ao procedimento de abertura completa de todo o trato gastrointestinal e abertura da aorta esquerda e direita, não foi cumprido rigorosamente em todas as necrópsias, assim como o exame ao nível do sistema nervoso.

No final das 42 necrópsias foram enviadas para o laboratório de Anatomia Patológica da Universidade de Évora 150 amostras para uma análise histopatológica. Conforme ilustrado na tabela 8, apenas 17% das amostras não se encontravam em condições de observação. As amostras piores foram as congeladas, nas quais se observou autólise dos tecidos ou o mais provável a lise das células devido à formação de cristais de gelo durante a congelação.

Tabela 8 – Tabela de distribuição de frequências absolutas de cada amostra de órgão (n = 150).

Órgão	N.º de amostras em condição de observação	N.º de amostras sem condição de observação			N.º total de amostras
		Congelação	Parasitismo	Sete dias de refrigeração	
Pulmão	27	1	-	1	29
Fígado	23	5	1	1	30
Coração	22	3	1	1	27
Rim	22	3	1	1	27
Baço	19	5	-	1	25
Tiroide	1	-	-	-	1
Testículos	1	-	-	-	1
Bexiga	3	-	-	-	3
Estômago	3	-	-	-	3
Intestino	3	-	-	-	3
Pele	1	-	-	-	1
Total	125	25			150
%	83%	17%			

Quanto às alterações macroscópicas dos órgãos, representadas na tabela 9, optou-se por contabilizar o número de alterações de cada órgão, relativamente ao número total de necrópsias realizadas (n = 42), obtendo-se a frequência relativa de cada órgão. Na tabela 9 observa-se que o fígado apresentou uma maior percentagem de alteração macroscópica (69%), seguindo-se a bexiga (31%), o intestino (31%), o pulmão (21%) e o coração (12%). O baço e o rim não apresentaram qualquer alteração macroscópica relevante. Quanto às alterações macroscópicas da pele, da carapaça e do plastrão optou-se por descrevê-las posteriormente, juntamente com as respetivas imagens.

Tabela 9 – Tabela de distribuição de frequências relativas de cada órgão com alteração macroscópica (n = 42).

Órgão	Número de órgãos alterados macroscopicamente	Frequência relativa de cada órgão alterado
Fígado	29	69%
Bexiga	13	31%
Intestino	13	31%
Pulmão	9	21%
Coração	5	12%

Quanto às alterações microscópicas dos órgãos, conforme ilustrado na tabela 10, optou-se por contabilizar o número de alterações de cada órgão, relativamente ao número total de amostras do respetivo órgão em condição de observação ao microscópico (n), obtendo-se a frequência relativa de cada órgão. Na tabela 10 observa-

-se que o rim e o fígado apresentaram uma maior percentagem de alteração microscópica (74%), seguindo-se a bexiga (67%), o coração (55%), o pulmão (26%) e o baço (11%). Relativamente à pele, optou-se por não se colocar na tabela por se ter apenas recolhido uma amostra de um abscesso cutâneo. Os restantes órgãos encontravam-se dentro dos critérios normais.

Tabela 10 – Tabela de distribuição de frequências relativas de cada órgão com alteração microscópica (N = 116).

Órgão	N.º de amostras em condição de observação (n)	Número de órgãos alterados microscopicamente	Frequência relativa de cada órgão alterado
Fígado	23	17	74%
Rim	22	17	74%
Bexiga	3	2	67%
Coração	22	12	55%
Pulmão	27	7	26%
Baço	19	2	11%
	N = 116		

O estabelecimento de diagnósticos presuntivos concretizou-se com o auxílio dos resultados das observações macroscópicas e microscópicas, no entanto foi necessário realizar uma pesquisa bibliográfica. Com o intuito de realizar um balanço das patologias das tartarugas necropsiadas, representado na tabela 11, optou-se por contabilizar o número de patologias presente em cada indivíduo, relativamente ao número total de necrópsias realizadas (n = 42), obtendo-se a frequência relativa de cada patologia. Na tabela 11 observa-se que surgiram mais casos de lipidose hepática (67%), de septicémia (48%) e de doença ulcerativa cutânea (41%). No entanto, é de salientar que a grande maioria dos animais apresentava várias patologias concomitantes.

Tabela 11 – Diagnósticos presuntivos. Tabela de distribuição de frequências relativas de cada patologia (n = 42).

Patologia/Diagnóstico	Nº de tartarugas observadas	Frequência relativa de cada patologia
Lipidose hepática	28	67%
Septicemia	20	48 %
Doença ulcerativa cutânea sistêmica	17	41%
Doença renal	12	29%
Deformidades na carapaça e plastrão	5	12%
Impactação intestinal	5	12%
Estase folicular	4	10%
Pneumonia	4	10%
Abcesso cutâneo/subcutâneo	3	7%
Celomite	2	5%
Parasitismo	1	2%
Torção uterina	1	2%

Após ter sido feita uma abordagem geral dos diferentes casos observados ao longo deste trabalho, procurou-se organizar e estruturar os mesmos por tópicos, nos quais se encontram descritos as alterações do ponto de vista macroscópico, microscópico e o tipo de patologia presuntiva.

A maioria da bibliografia referente às patologias dos quelônios encontra-se centrada nos animais de cativeiro, não havendo muitos estudos sobre patologias em animais selvagens. Em virtude das tartarugas deste estudo apresentarem um historial de vida de cativeiro, antes de serem libertadas para o meio selvagem, optou-se por descrever alguns fatores predisponentes para o desenvolvimento de determinada patologia. Neste trabalho, colocou-se a hipótese de muitas destas tartarugas terem desenvolvido patologias durante o cativeiro e de serem portadoras das mesmas após a sua libertação no meio selvagem.

Carapaça, plastrão e pele.

Quanto às alterações macroscópicas na carapaça, plastrão e pele, representadas na figura 2, observaram-se 17 exemplares de tartarugas com úlceras na carapaça e no plastrão e uma com uma úlcera no membro posterior esquerdo.



Figura 2 – Úlceras na carapaça, plastrão e na pele numa tartaruga da Flórida (*Trachemys scripta*).

Segundo Rossi, as lesões ulcerativas da pele são uma “quebra da continuidade da epiderme com perda de substância e exposição da camada interna (derme) ou dos tecidos mais profundos” (Rossi 1996). As causas do aparecimento de úlceras podem ter origem numa dermatite infecciosa (bactérias e fungos), queimaduras, assim como provocadas por mordeduras de invertebrados (durante a hibernação) e de outras tartarugas ou predadores.

As doenças ulcerativas das carapaças nos quelônios, especialmente nas espécies aquáticas (Wallach 1975; Wallach 1977), estão associadas à ausência de cuidados de higiene, agressões entre as espécies, temperaturas baixas, disecdisse ou interrupção vascular do osso dérmico. Por conseguinte, existe a penetração da camada de queratina externa da carapaça e este tipo de lesão pode ficar confinado na mesma ou evoluir e tornar-se sistémico (septicémia). No caso das tartarugas examinadas pressupõe-se que as principais causas tenham sido provocadas por agressões do meio ambiente selvagem e também por outras espécies. No entanto, existe a possibilidade das mesmas serem portadoras deste tipo de lesões provocadas pelas más condições de higiene, que tiveram durante a sua vida em cativeiro.

Uma específica patologia designada por doença ulcerativa cutânea septicémica (*Septicemic cutaneous ulcerative disease* - SCUD) tem sido observada em espécies de água doce no Norte de América e na Europa. Esta tem sido descrita como uma síndrome afetando com maior frequência o género *Apalone* sp. (Frye 1991 a). As lesões após um trauma ou outro tipo de agressão apresentam-se na forma de úlceras, ou seja, têm um aspeto tipo cratera (figura 2) e/ou caseoso à superfície dos escudos (úlceras necróticas). Os sinais clínicos desta patologia são subjetivos e incluem a presença de anorexia,

letargia e sinais de septicémia (plastrão hiperémico, presença de heterófilos tóxicos e bactérias no esfregaço de sangue). Neste caso, pode surgir necrose hepática, paralisia e a morte (Frye 1991 a). Uma variedade de bactérias tem sido isolada, incluindo a *Citrobacter* spp., *Serratia* spp. e a *Beneckea* spp (Cooper 2006). Outrora, pensava-se que o agente etiológico fosse a *Citrobacter freudii* (Kaplan 1957), no entanto, as poucas condições de alojamento e as bactérias Gram negativas, estão sem dúvida envolvidas na ocorrência desta patologia (Marcus 1981; Frye 1991 a).

Neste caso, como pode estar envolvido uma grande variedade de organismos deve-se recorrer à cultura e ao teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA). A melhoria na qualidade de água e o cuidado tópico sobre as lesões são fatores imprescindíveis no tratamento (limpeza, desbridamento e aplicação de agentes antimicrobianos com preparações de iodo).

Neste âmbito, foi ainda constatada a presença de zonas de descoloração da carapaça e exposição do osso dérmico (figura 3), assim como algumas deformidades na carapaça e plastrão (figura 4).



Figura 3 – Descoloração da carapaça (imagem à esquerda) e osso dérmico exposto (imagem à direita) numa tartaruga da Flórida (*Trachemys scripta*).



Figura 4 – Imagem à esquerda e central - Deformação da carapaça de uma tartaruga da Flórida (*Trachemys scripta*). Imagem à direita – Deformação do plastrão de uma tartaruga corcunda do Mississípi (*Graptemys pseudogeographica*).

As áreas brancas na carapaça (figura 3) representam lesões da mesma ou lesões de osso exposto cicatrizadas, depósitos minerais ou infecções contínuas (Boyer 2006). Contudo, esta descoloração pode também ser devido a septicémia ou a um trauma físico. A carapaça da tartaruga possui uma capacidade de renovação elevada, onde as áreas de osso exposto podem ser deslocadas e substituídas pelos novos escudos. Num juvenil em crescimento acelerado as áreas brancas podem surgir entre os escudos (nas margens dos mesmos) tornando-se pretas com a idade (McArthur 2008 h).

As deformidades da carapaça dos quelónios podem surgir por diversas causas, nomeadamente, por via iatrogénica, trauma devido ao calor excessivo, encerramento prematuro das placas de crescimento, deformações congénitas (ex. condições de incubação inapropriadas), crescimento juvenil acelerado e hiperparatiroidismo nutricional secundário (McArthur 2008 h). No caso dos animais de cativeiro, as causas mais frequentes são o hiperparatiroidismo nutricional secundário e o trauma físico (Boyer 2006). No entanto, o aparecimento de escudos anormais pode dever-se a causas congénitas ou o resultado de várias doenças metabólicas ósseas (Boyer 2006).

Num exemplar de tartaruga juvenil, representado na figura 4, observou-se que ocorreu o encerramento prematuro das placas de crescimento dos escudos dorsais. O crescimento realizou-se apenas ao nível dos escudos marginais, mantendo-se a carapaça de cria. Como os músculos peitorais e pélvicos dos quelónios são muito fortes observou-se que os mesmos deslocaram os escudos marginais no sentido dorsal, antes de completar o processo de calcificação da carapaça. O resultado desta alteração neste caso pressupõe a falta de condições essenciais de alojamento e de nutrição.

Quanto às deformidades ou lesões no plastrão apontam-se como principais causas a septicémia, o trauma térmico, poucas condições de higiene no *vivarium*, alojamento inadequado e infecções necrosantes (McArthur 2008 h).

Nas deformações de plastrão dos exemplares analisados (figura 4), constatou-se que a existência de infecções e necrose do plastrão durante a fase juvenil teve como resultado a deformação dos escudos. Neste caso específico pode ter sido causado por ausência de cuidados de higiene e na precária qualidade da água.

Por último, dentro desta temática de alterações do sistema tegumentar, observaram-se três casos de tartarugas com abscessos cutâneos e subcutâneos representados pela figura 5 e 6. Conforme ilustrado na figura 5, os abscessos subcutâneos

apresentavam uma delimitação por cápsula e um conteúdo purulento de cor branca e consistência pastosa (abscesso caseoso subcutâneo).

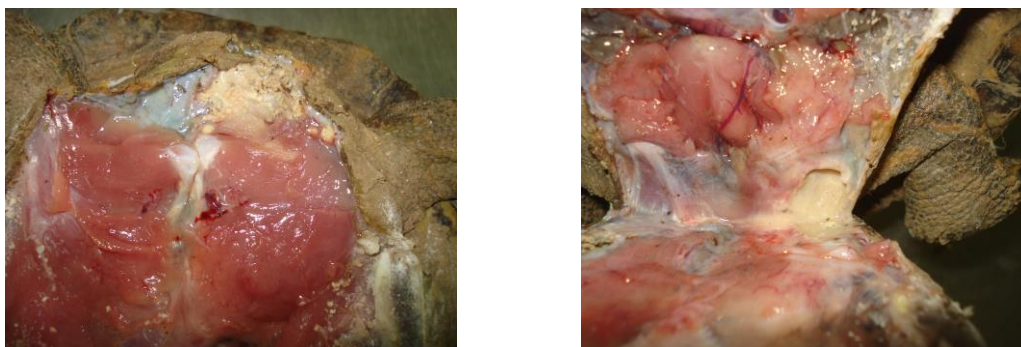


Figura 5 – Abscesso caseoso subcutâneo num cágado mediterrâneo (*Mauremys leprosa*).

Conforme explicitado na figura 6, observou-se um caso de tartaruga com um abscesso no interior do plastrão, onde se verificou o aspeto bem delimitado da lesão por uma cápsula e o conteúdo sólido, homogêneo e amarelo. Também se observou outro caso de um abscesso cutâneo na zona axilar, compreendendo a porção proximal do membro anterior esquerdo.

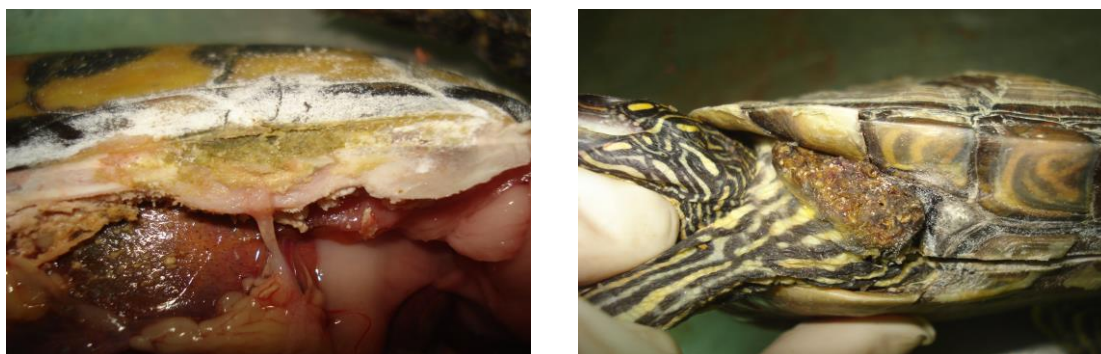


Figura 6 – Abscesso sólido no interior do plastrão (imagem à esquerda) numa tartaruga da Flórida (*Trachemys scripta*) e abscesso no membro anterior esquerdo (imagem à direita) numa tartaruga corcunda do Mississípi (*Graptemys pseudogeographica*).

Ao contrário dos mamíferos que apresentam um exsudado supurativo cremoso ou líquido derivado de neutrófilos, os répteis apresentam exsudados sólidos com heterófilos (Montali 1988; Huchzermeyer and Cooper 2000). Esta diferença macroscópica dos exsudados tem sido atribuída à atividade enzimática hidrolítica ou à ausência de proteases nos heterófilos (Montali 1988).

Os abscessos subcutâneos nas tartarugas localizam-se com maior incidência no ouvido, membros, locais de injeção, à volta do pescoço e área retrobulbar.

Normalmente, estes abscessos resultam de uma perfuração por um corpo estranho durante a retração da cabeça ou a através dos movimentos de locomoção (McArthur 2008 i). A maioria dos casos, tais como os apresentados nas figuras 5 e 6, são exemplos dessas zonas propícias.

Os exsudados sólidos devem ser distinguidos das áreas de tecido necrótico ou fibrina organizada, assim como dos casos de tartarugas com hipovitaminose A, onde se observa as acumulações de queratina na metaplasia escamosa das glândulas oftálmicas e do ouvido médio (abscessos auriculares) (Elkan and Zwart 1967; Brown, Richards et al. 2004). Os exsudados, especialmente nos abscessos subcutâneos, podem ser identificados a partir de um corte histológico por apresentarem camadas concêntricas de material sólido. O diagnóstico de um abscesso baseia-se na aspiração do conteúdo para citologia, para cultura microbiológica e na histopatologia.

Neste estudo o mais correto seria a realização da aspiração do conteúdo dos abscessos, a preparação de um exame de citologia e de uma cultura bacteriana com intuito de observar o tipo de bactérias presentes no interior dos mesmos. No entanto, devido a recursos limitados, apenas se recolheu uma amostra do abscesso axilar do animal, representado na figura 6 (imagem à esquerda), para histopatologia.

Na observação microscópica da amostra de pele, representada pela figura 7, constatou-se que a origem deste abscesso possa ter sido inicialmente uma solução de continuidade na pele, por onde houve uma infiltração de agentes microrganismos e/ou de corpos estranhos. Como a zona da lesão situava-se numa área de pele com muito movimento e atrito desenvolveu-se uma reação inflamatória massiva de caráter crónico, resultando num caso de hiperqueratose paraqueratótica. Conforme explicitado na figura 7, verificou-se a presença de uma infiltração massiva por células inflamatórias (i), de hiperplasia celular (►), de pérolas de queratina, de lamelas de queratina (f) e na periferia a presença de colónias bacterianas.

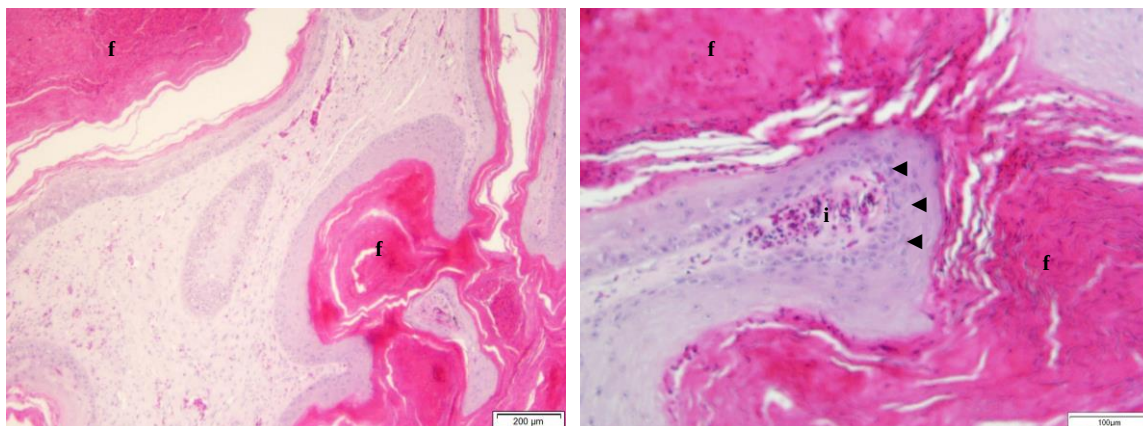


Figura 7 – Abscesso subcutâneo no membro anterior esquerdo da tartaruga corcunda do Mississípi (*Graptemys pseudogeographica*) representada na figura 6 (imagem à esquerda). Quelônio. H-E. 40x e 100X.

A causa dos abscessos é habitualmente de origem bacteriana. Encontram-se frequentemente envolvidas neste tipo de lesões as *Aeromonas* sp. e as *Pseudomonas* sp., no entanto podem estar presentes outros tipos de organismos entre os quais a *Actinobacillus* sp. (Jacobson 1992), a *Arizona* sp. (Hoff and Hoff 1984; Jacobson 1992), a *Corynebacterium* sp. (Rossi 1996), a *Edwardsiella* sp., a *Escherichia coli*, a *Klebsiella* sp., a *Neisseria* sp., a *Pasteurella* sp., o *Proteus* sp. e a *Providencia* sp. A *Serratia* sp. foi a primeira bactéria isolada como causa de abscesso nos répteis por mais de 60 anos (Duran-Reynals and Clausen 1937). A presença dos anaeróbios pode muitas vezes ser significativa. A *Mycobacterium* sp. pode ocasionar lesões do tipo abscesso, no entanto estão mais associadas a infeções profundas (Rossi, Frye et al. 1976; Frye 1981; Frye 1991 a; Ryan 1992). A *Salmonella* sp. muitas vezes é isolada a partir dos abscessos ou de outras lesões cutâneas nos répteis (Jacobson 1992; Mader and DeRemer 1993).

No que concerne à bibliografia sobre o tipo de bactérias presentes nas tartarugas como causa de uma determinada patologia, verificou-se que é relativa e seguidamente procurou-se debater o assunto nos casos de tartarugas com septicémia.

Neste trabalho deduziu-se que muitos casos de septicémia se iniciaram a partir dos abscessos cutâneos e subcutâneos.

Coração, Baço, Fígado, Rins e Pulmões

Neste estudo uma das patologias mais relevantes e que demonstrou a sua complexidade ao longo do trabalho laboratorial foi a septicémia.

A maioria das tartarugas observadas apresentou morte súbita, no entanto visualizaram-se algumas alterações macroscópicas, entre as quais o eritema no plastrão.

Do ponto vista macroscópico dos órgãos, representado na figura 8, constataram-se apenas algumas alterações relacionadas provavelmente com a patologia. Verificou-se que os casos de septicemia revelaram uma congestão marcante dos vasos sanguíneos das vísceras, principalmente do trato gastrointestinal, assim como a parede do intestino revelou uma coloração mais pálida. Conforme explicitado na figura 9, alguns casos também revelaram um coração com o ventrículo pálido (V).



Figura 8 – Alterações macroscópicas de intestino observadas durante as necrópsias, associadas a septicemia.

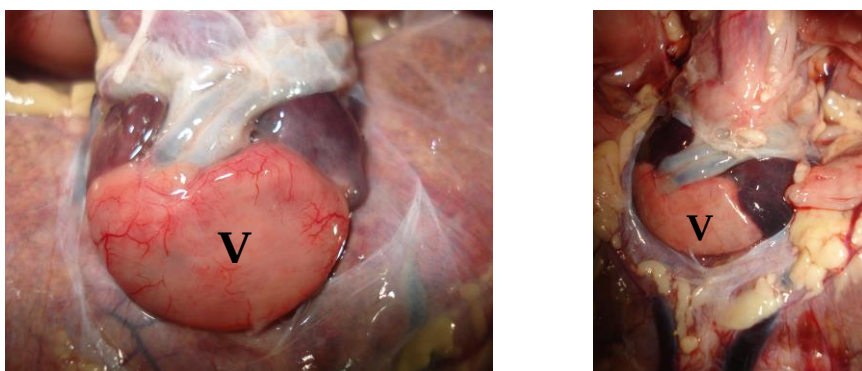


Figura 9 – Alterações macroscópicas de coração observadas durante as necrópsias, associadas a septicemia.

O diagnóstico foi estabelecido *post mortem* com base na histopatologia. Neste caso particular, diferentes órgãos foram afetados, entre os quais o coração, o baço, o fígado, os rins e os pulmões.

As possíveis causas desta patologia foram as seguintes: presença de úlceras cutâneas, abscessos cutâneos ou subcutâneos; existência de pneumonia bacteriana ou micótica; corpo estranho na bexiga; estase folicular; celomite; torção uterina e

impactação intestinal. Portanto, neste estudo, a septicémia não foi considerada apenas uma patologia, esteve sempre associada a uma outra doença concomitante.

Dentro do contexto histopatológico, neste trabalho obteve-se o privilégio de visualizar e interpretar a resposta imunitária das tartarugas perante a presença de bactérias.

As manifestações iniciais num processo inflamatório dos répteis são semelhantes às observadas nos mamíferos. Nos répteis, assim como nos outros processos fisiológicos, a resposta imunitária (incluindo a inflamatória) pode ser afetada pela temperatura ambiente, a qual pode influenciar no que diz respeito à rapidez, composição e duração da resposta. Por exemplo, num estudo observou-se uma diminuição da atividade oxidativa dos macrófagos peritoneais de uma tartaruga da Flórida (*Trachemys scripta*) na presença de temperaturas baixas (Pasmans, De Herdt et al. 2001).

De acordo com a literatura, as primeiras células inflamatórias observadas em experiência e no caso de doença tem sido os heterófilos, seguindo os monócitos ou macrófagos (Stacy and Pessier 2007). Num estudo, do ponto vista histológico, ao longo de sete dias as células inflamatórias foram dispostas num discreto aglomerado organizado no sentido concêntrico (granuloma) e observou-se a presença de células gigantes multinucleadas. A neovascularização e a fibroplasia foram observadas a partir do décimo quarto dia (Stacy and Pessier 2007).

A figura 10 (a) representa uma reação inflamatória de carácter agudo, onde ocorreu uma infiltração de heterófilos no tecido renal que circunda as colónias bacterianas. Na figura 10 (b) observa-se a presença de diversos granulomas com células inflamatórias, indicando uma reação granulomatosa representativa (reação inflamatória de carácter crónico).

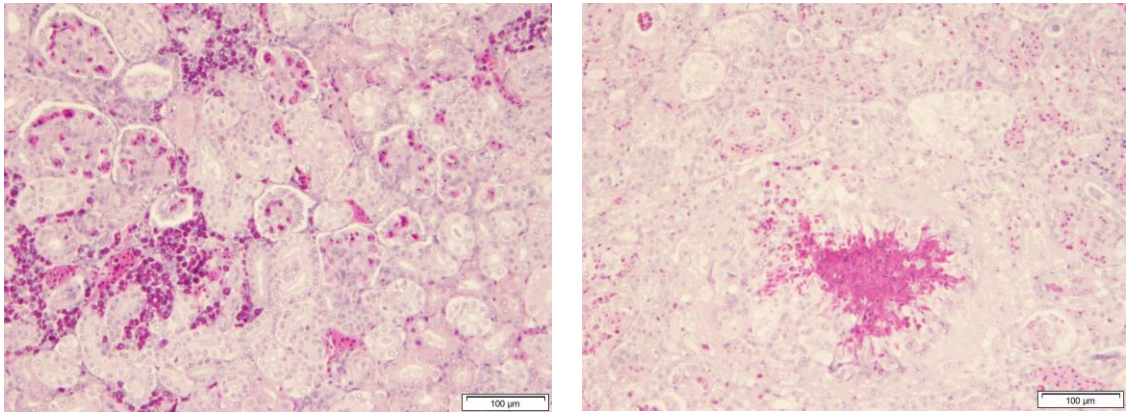


Figura 10 – Rim. Reação inflamatória aguda. (a) Imagem à esquerda – Infiltração por heterófilos no tecido renal. (b) Imagem à direita – Formação de um granuloma de heterófilos. Quelônio. H-E. 100x

A figura 11 (a) representa uma amostra de fígado, onde se visualizou a presença de granulomas com colônias bacterianas no seu centro (círculos vermelhos). Conforme explicitado na figura 11 (b) observou-se a presença de heterófilos, macrófagos e monócitos circundando um pigmento dourado (melanina).

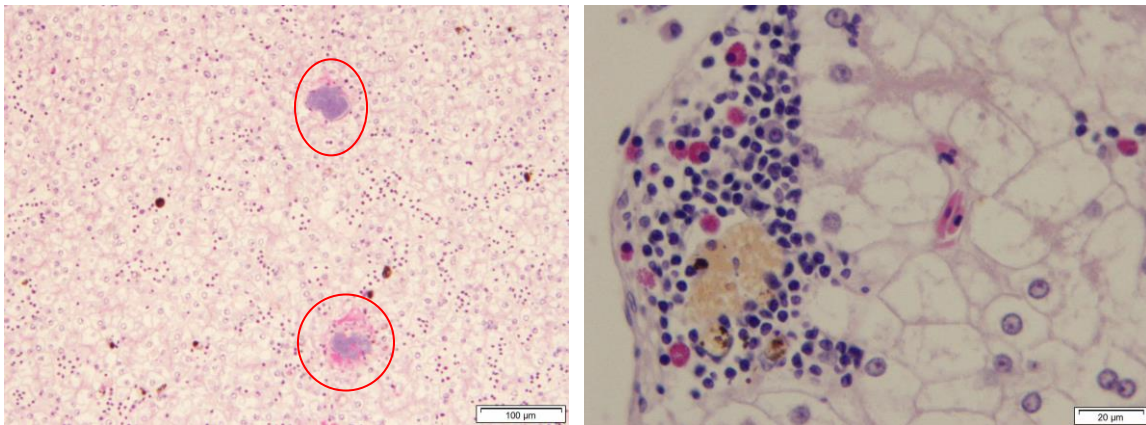


Figura 11 – Fígado. (a) Imagem à esquerda – Granuloma. Quelônio. H-E. 100x (b) Imagem à direita – Infiltração de heterófilos, macrófagos e monócitos. Pigmento de melanina. Quelônio. H-E 400x

Durante a observação dos cortes histológicos verificou-se a dificuldade de diferenciar os heterófilos dos eosinófilos, tendo-se optado por classificar as mesmas células como acidófilos. No entanto, deduziu-se que as células fossem heterófilos sendo considerado que as mesmas são as primeiras a chegar numa reação inflamatória aguda.

Na literatura antiga pode-se encontrar o termo coletivo acidófilos para os leucócitos que apresentam grânulos citoplasmáticos eosinofílicos proeminentes, ou seja, os heterófilos e os eosinófilos (Montali 1988). Atualmente, os heterófilos e os eosinófilos representam duas linhas de células distintas e separadas (Mateo, Roberts et

al. 1984; Montali 1988; Sypek and Borysenko 1988; Alleman, Jacobson et al. 1992; Garner, Homer et al. 1996; Harr, Alleman et al. 2001; Azevedo and Lunardi 2003).

Nos esfregaços de sangue os heterófilos apresentam muitos grânulos citoplasmáticos fusiformes que podem ser distinguidos dos grânulos citoplasmáticos redondos dos eosinófilos. A diferenciação dos heterófilos em relação aos eosinófilos normalmente é possível apenas em esfregaços de sangue, preparações citológicas de medula óssea e exsudados. Nos cortes histológicos não são facilmente distinguidos devido ao procedimento aplicado na histologia que distorce a morfologia dos grânulos citoplasmáticos (Montali 1988; Garner, Homer et al. 1996), razão pela qual neste estudo surgiu a dificuldade de identificar o tipo de células presente nos tecidos numa reação inflamatória aguda.

Os heterófilos são o equivalente aos neutrófilos nos mamíferos e tem sido demonstrada a capacidade fagocítica dos mesmos contra as bactérias e materiais estranhos (Mateo, Roberts et al. 1984; Montali 1988; Sypek and Borysenko 1988; Jacobson, Adams et al. 1997). Do ponto de vista citoquímico, os heterófilos dos quelónios são negativos em relação à benzidina peroxidase (Mateo, Roberts et al. 1984; Alleman, Jacobson et al. 1992; Alleman, Jacobson et al. 1999), ao ferro e aos pigmentos de melanina, sendo uma forma de identificar os mesmos (Stacy, B. A. and Pessier, A. P. 2007).

Nos cortes histológicos, os heterófilos não degenerados (figura 10 (a) e 11 (b)) apresentavam muitos grânulos citoplasmáticos eosinofílicos (laranja avermelhado) e um núcleo redondo ou lobulado. Conforme ilustrado na figura 12, os heterófilos degenerados e desgranulados podem assemelhar-se aos macrófagos, sendo necessária atenção na diferenciação de células numa reação inflamatória (Montali 1988). Na figura 12 observou-se uma infiltração massiva por células inflamatórias no tecido intersticial (i) e no interior dos glomérulos renais (g), devido à presença de colónias bacterianas no tecido renal.

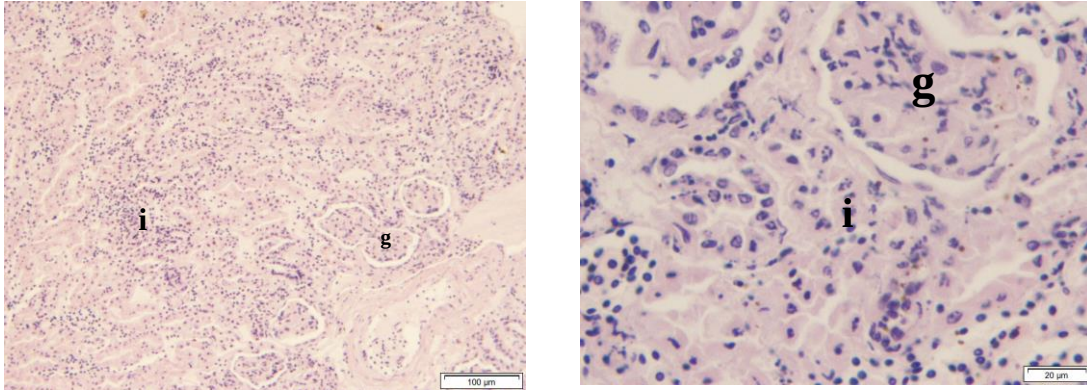


Figura 12 – Rim. Nefrite intersticial (i) e glomerular (g). Quelónio. H-E. 100x e 400x

A formação de granulomas é considerada a marca de muitas reações inflamatórias nas espécies reptilianas, a qual representa a resposta do organismo na presença de várias infeções bacterianas, fúngicas e parasitárias (Stacy and Pessier 2007).

As tartarugas deste estudo, conforme representado nas seguintes figuras 13, 14 e 15, revelaram reação granulomatosa em diferentes órgãos, devido à presença de colónias bacterianas, as quais se encontram caracterizadas pelas zonas basófilas e finamente granulares.

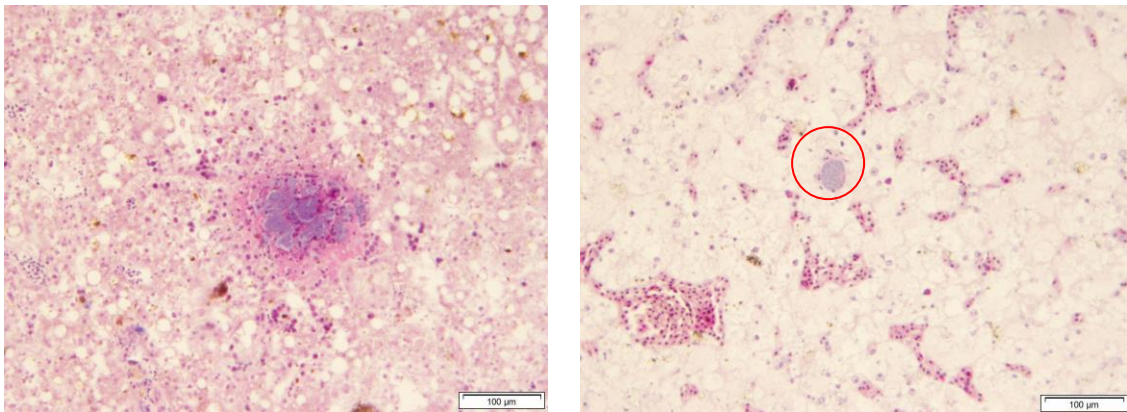


Figura 13 – Fígado. Granuloma. Colónias de bactérias (assinaladas com círculo). Quelónio. H-E. 100x

Na figura 14 observaram-se colónias bacterianas (no miocárdio) e infiltração de poucos heterófilos e muitos macrófagos em torno das mesmas, formando granulomas (fase inicial).

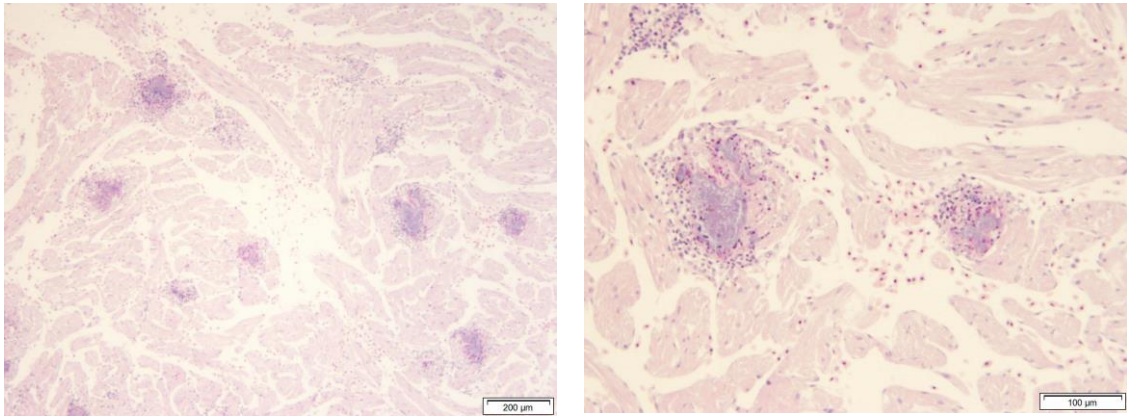


Figura 14 – Coração. Colônias bacterianas. Quelônio. H-E. 40x e 100x

A figura 15 representa um caso de septicemia, onde se observou alguma congestão e a presença de êmbolos bacterianos no interior dos vasos. Ao exame microscópico, estes êmbolos sépticos eram caracterizados por bactérias com um aspeto basófilo e finamente granular, não refringente. Suspeitou-se que o animal apresentava uma pneumonia bacteriana.

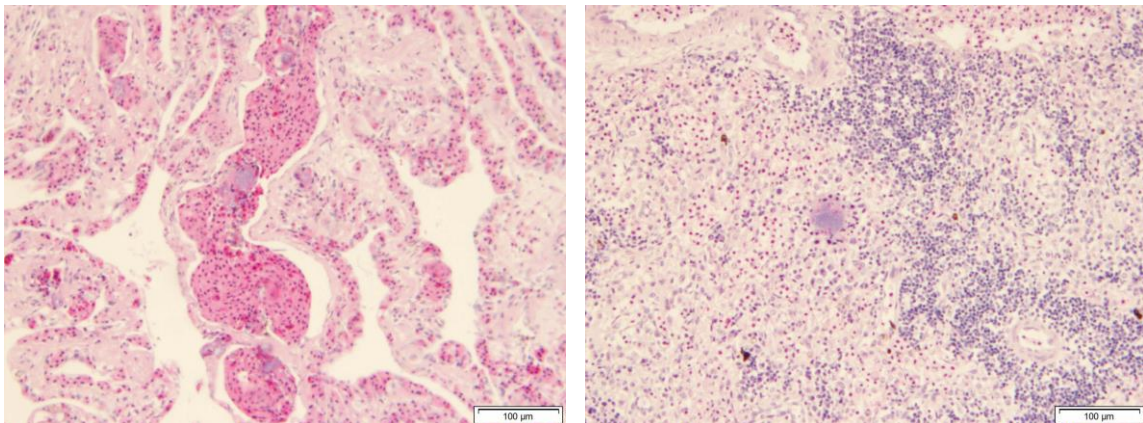


Figura 15 – (a) Imagem à esquerda – Pulmão. Pneumonia bacteriana. Septicemia. Quelônio. H-E. 100x
(b) Imagem à direita – Baço. Colônias bacterianas. Septicemia. Quelônio. H-E. 100x

Segundo a literatura, atualmente considera-se a existência de dois tipos de granulomas com patogénese diferente: o granuloma heterofílico e o granuloma histiocítico (Montali 1988). Do ponto vista morfológico, os dois tipos de granulomas diferenciam-se de acordo com a composição do respetivo centro. O granuloma heterofílico apresenta heterófilos necróticos e degenerados, enquanto o granuloma histiocítico apresenta macrófagos degenerados. O conhecimento do tipo de granuloma permite ajudar no diagnóstico e compreender como modelo a resposta do hospedeiro na

presença de agentes infecciosos. Um terceiro tipo de granuloma, o granuloma crónico, representa a fase terminal da lesão que inicialmente era formada por um granuloma heterofílico ou histiocítico (Montali 1988; Soldati, Lu et al. 2004).

O granuloma heterofílico é uma lesão inflamatória associada a agentes patogénicos extracelulares, inclui a maioria das infeções bacterianas e fúngicas, assim como as lesões teciduais que resultam da infiltração de grande quantidade de heterófilos (Stacy and Pessier 2007). Neste estudo observaram-se mais granulomas heterofílicos associados a infeções bacterianas (agente patogénico extracelular).

A formação de um granuloma heterofílico inicia-se com a acumulação localizada dos heterófilos no local de infeção ou lesão (abcesso heterofílico) (Montali 1988). Os heterófilos no centro do abcesso (**C**) entram numa fase de desgranulação e tornam-se necróticos (**hd**), enquanto na periferia da lesão se encontram heterófilos intatos e viáveis (figura 16). Seguidamente, os macrófagos acumulam-se na periferia (**m**), formando o granuloma heterofílico (figura 16). O infiltrado de células linfóides e a fibrose periférica, comum nos granulomas dos mamíferos, são características de cronicidade e normalmente não estão presentes, exceto se o granuloma heterofílico se encontra em transição para um granuloma crónico (figura 18) (Montali 1988). Nalguns casos os macrófagos podem ser numerosos num granuloma heterofílico, dificultando a diferenciação do mesmo. Quando se encontram presentes os agentes indutores, tais como as colónias bacterianas ou as hifas fúngicas, estes localizam-se normalmente no interior do centro do granuloma (**C**) conjuntamente com os heterófilos necróticos (**hd**) (Stacy, B. A. and Pessier, A. P. 2007).

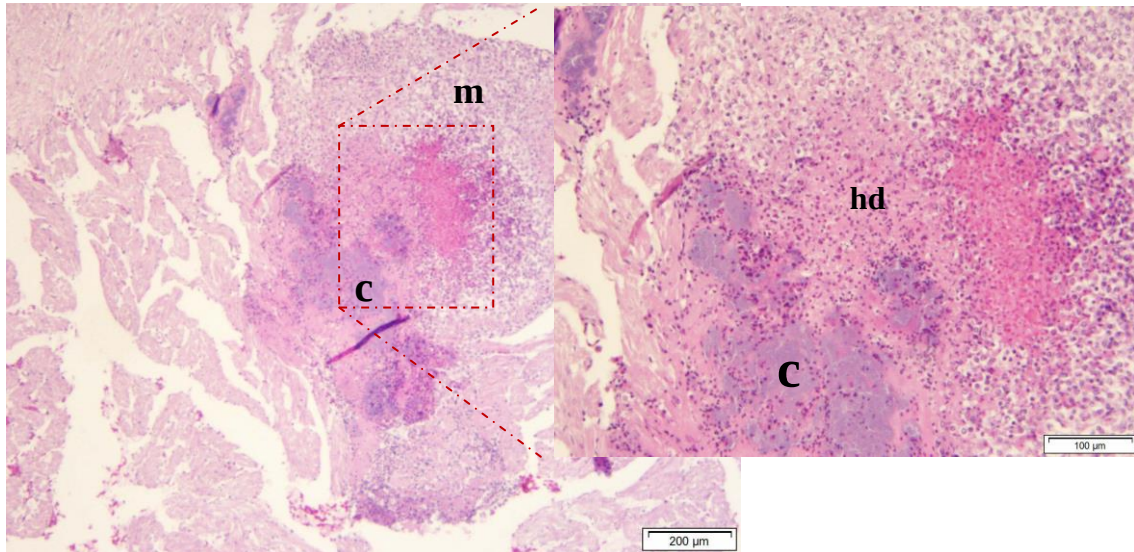


Figura 16 – Coração. Colônias bacterianas. Granuloma heterofílico. Quelônio. H-E. 40x e 100x.

Neste último caso, como a suspeita recaiu na presença de bacilos bacterianos de putrefação ou bacilos ácido-álcool resistentes (exemplo tuberculose) optou-se por realizar uma coloração diferencial de *Ziehl-Neelsen*. Conforme ilustrado na figura 17, o resultado foi negativo, não se observou a coloração vermelha dos bacilos, concluindo-se da presença de bactérias cocos.

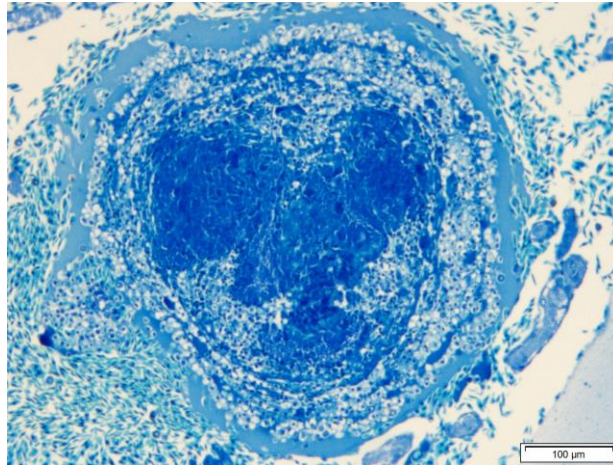


Figura 17 – Coração. Granuloma heterofílico. Quelônio. *Ziehl-Neelsen*. 100x

A formação destes granulomas não é limitada a tecidos sólidos, pode ocorrer também no interior de estruturas ocas, tais como as vias aéreas, na superfície da pele e nas mucosas. O mecanismo de formação de granuloma heterofílico tem sido comparado a uma reação de corpo estranho, onde os heterófilos degenerados ou componentes de grânulos heterofílicos induzem uma resposta granulomatosa (Montali 1988). Como os exsudados dos répteis não são líquidos tem sido sugerido que a formação de granulomas

heterofílicos possa ser um meio de dispersão dessas lesões (Stacy, B. A. and Pessier, A. P. 2007). Neste estudo suspeitou-se que alguns casos em que a reação granulomatosa se encontrava presente tiveram origem a partir de abscesso caseoso cutâneo ou subcutâneo.

Os granulomas histiocíticos encontram-se frequentemente associados à presença de bactérias obrigatoriamente intracelulares, tais como a *Mycobacterium* sp. ou a *Chlamydia* sp., mas também podem ser observados nos casos de infecções fúngicas (Montali 1988; Jacobson, Origgi et al. 2002; Soldati, Lu et al. 2004).

A persistência dos granulomas heterofílicos ou histiocíticos eventualmente conduz à transição de um granuloma crónico (figura 18). Os macrófagos que normalmente são epitelioides predominam nos granulomas crónicos e encontram-se envolvidos por tecido conjuntivo fibroso, vários tipos de linfócitos e plasmócitos. Os granulomas crónicos apresentam frequentemente um centro de detritos amorfos que costuma ter uma aparência laminada evidente e nalgumas circunstâncias podem-se tornar mineralizados. Por vezes, torna-se difícil ou impossível determinar o mecanismo de origem de formação de um granuloma, principalmente se for um granuloma crónico de longa duração. Num estudo recente sobre a inflamação granulomatosa nos répteis determinou-se que a maioria (58/90) dos granulomas observados era do tipo crónico (Soldati, Lu et al. 2004).

Na figura 18, surgiu a oportunidade de visualizar um granuloma crónico, cuja origem etiológica foi difícil de identificar. Observou-se algum exsudado purulento e a presença de bactérias, deduziu-se que este animal apresentava uma pneumonia bacteriana. Neste caso realizou-se a coloração de *Gram* e o resultado foi a presença de cocos *Gram* positivos (apresentaram uma coloração roxa).

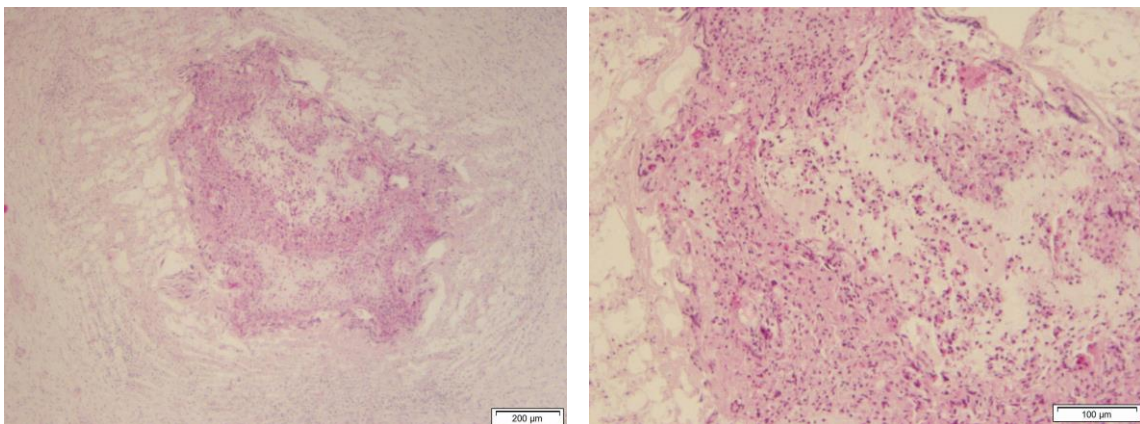


Figura 18 – Pulmão. Pneumonia bacteriana. Granuloma crónico. Quelónio. H-E. 40x e 100x

Relativamente aos casos dos ventrículos pálidos, do ponto de vista histológico (figura 19), observou-se que o músculo cardíaco se encontrava um pouco pálido. Nesta lâmina verificou-se também uma infiltração por células inflamatórias entre as fibras musculares. Considerou-se que estas alterações surgiram devido ao estado de septicémia do animal.

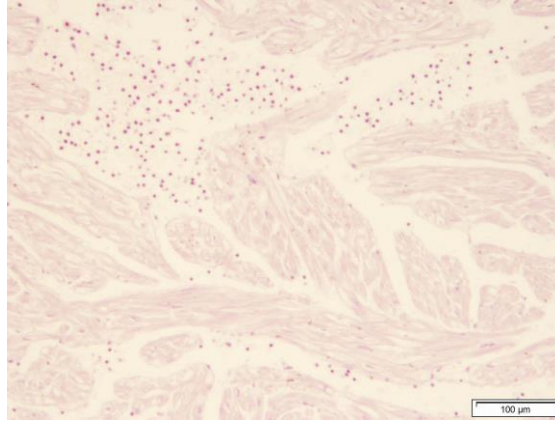


Figura 19 – Coração. Quelônio. H-E. 100x

Outra alteração observada nos casos de septicémia foi nas amostras de baço. Conforme explicitado na figura 20 e 21, verificou-se a resposta do baço perante um caso de septicémia, onde ocorreu uma grande proliferação de células inflamatórias (reação exuberante no interior do baço).

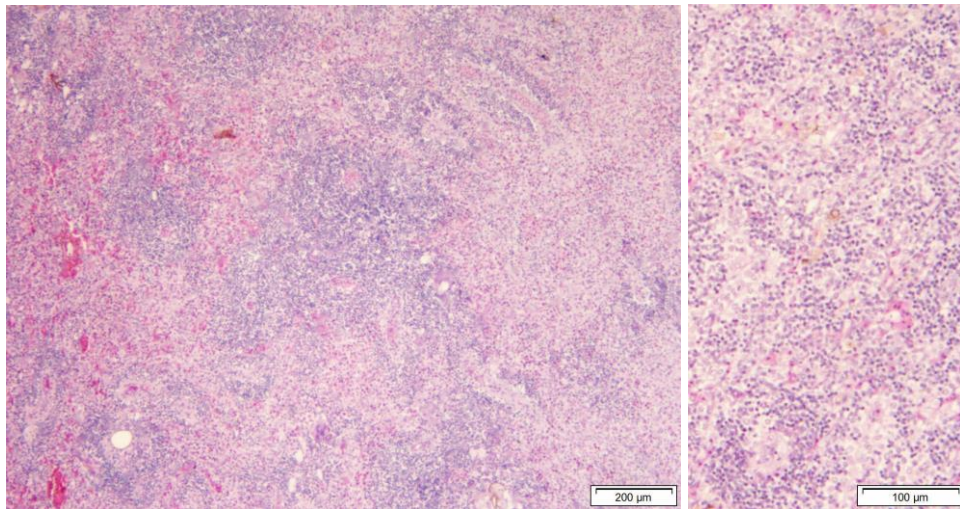


Figura 20 – Baço. Proliferação de células inflamatória. Septicémia. Quelônio. H-E. 40x e 100x

Na figura 21 observa-se uma grande proliferação de heterófilos.

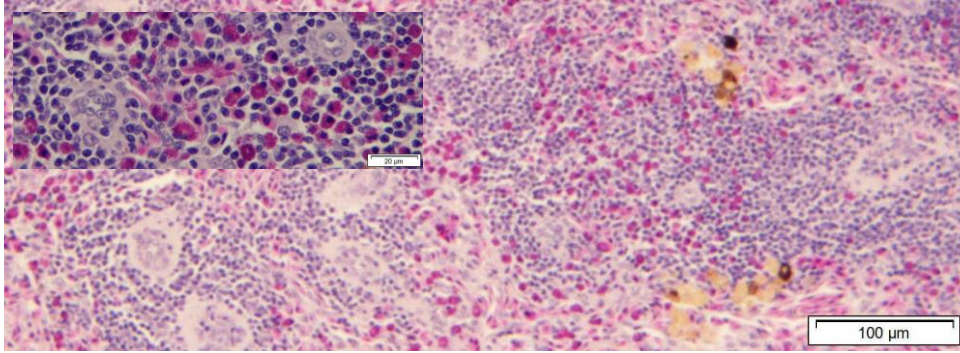


Figura 21 – Baço. Proliferação de células inflamatória. Heterofilia. Septicémia. Quelônio. H-E. 100x e 400x

Por fim, dentro dos casos de septicémia, representado na figura 22, observou-se nas amostras de fígado o aumento do tamanho dos centros melanomacrofágicos. Neste caso particular não se conseguiu diferenciar se ocorreu hiperplasia ou hipertrofia. Um dos fatores que contribuiu para este aumento pode ter sido a presença de septicémia.

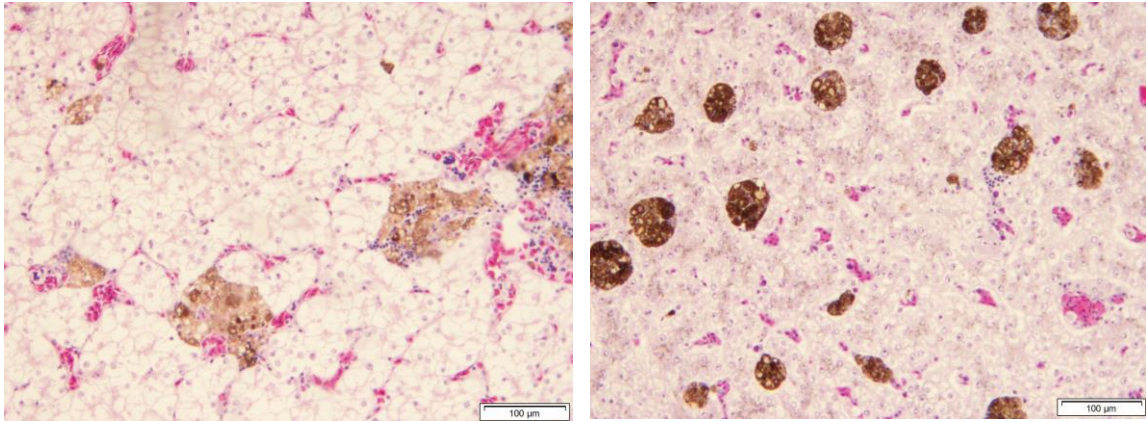


Figura 22 – Fígado. Centros melanomacrofágicos. Quelônio. H-E. 100x

Neste trabalho realizou-se o procedimento de despigmentação numa amostra de fígado para diferenciar a melanina da hemossiderina. O resultado, representado na figura 23, foi a saída do pigmento castanho, indicando a presença de melanina.

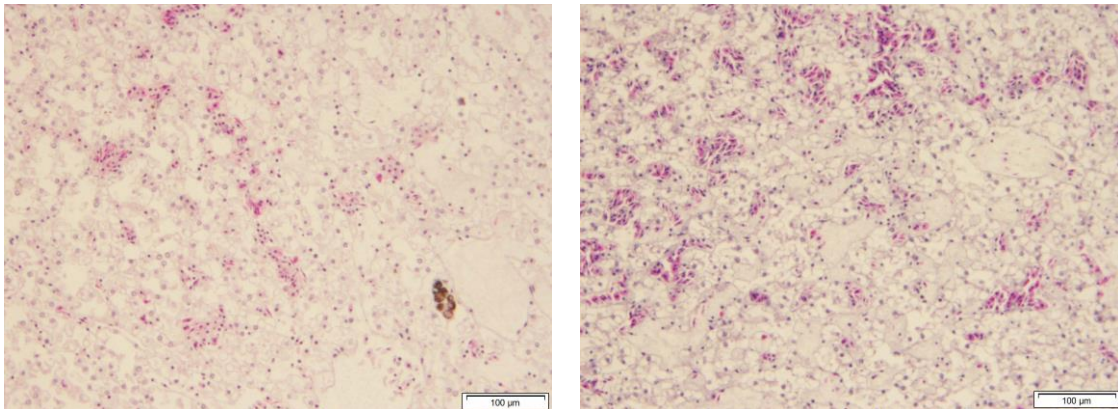


Figura 23 – Fígado. Melanina hepática. Despigmentação. Quelônio. H-E. 100x

De acordo com a bibliografia, consideram-se fisiológicas estas áreas de acumulação de melanina no fígado das tartarugas, designadas por centros melanomacrófágicos. Os melanomacrófagos são abundantes nos quelônios e sintetizam melanina (Scalia, Geremia et al. 1988), frequentemente contém outros pigmentos, tais como, a hemossiderina, a lipofuscina e a ceróide (Agius and Roberts 2003). Estas células são semelhantes aos macrófagos, pertencem ao sistema fagocítico mononuclear sistémico e foram encontradas nos peixes, anfíbios e répteis (Agius and Roberts 2003; Gyimesi and Howerth 2004; Stacy and Pessier 2007). No fígado estas células encontram-se aglomeradas formando os centros melanomacrófágicos e podem variar de tamanho e número. Em pouca quantidade podem existir no baço e rim, também se pode encontrar no local de inflamação crónica. Os pigmentos melanina nos melanomacrófagos podem potenciar ou facilitar a neutralização de radicais livres que são produzidos durante as fases catabólicas ou encontram-se relacionados com a síntese de componentes bactericidas (Stacy and Pessier 2007). A hipótese da função da melanina como eliminadora de radicais livres é suportada pela relação inversa entre quantidade de melanina hepática e a atividade da dismutase superóxida nos répteis (Sichel, Corsaro et al. 1987).

Em alguns casos, os melanomacrófagos funcionaram a temperaturas baixas demonstrando algum valor adaptativo na defesa do hospedeiro em animais heterotérmicos (Johnson, Schwiesow et al. 1999). Os melanomacrófagos fagocitam eritrócitos, microrganismos e outros detritos, por isso devem ser avaliados com atenção para pesquisa de agentes infecciosos (Stacy and Pessier 2007). Alguns autores têm sugerido que os centros melanomacrófágicos podem estar envolvidos no processamento de antígenos de um ponto de vista análogo ao dos centros germinativos no interior dos linfonódulos dos mamíferos (Ferguson 1976).

O aumento de tamanho destes centros é um achado comum não específico no diagnóstico de patologias dos répteis. Esta alteração muitas vezes é referida ou diagnosticada como hiperplasia melanomacrófágica, no entanto não é evidente se o aumento de tamanho representa uma hipertrofia (aumento do tamanho individual dos melanomacrófagos) ou uma hiperplasia (aumento do número de melanomacrófagos) (Gyimesi and Howerth 2004). A avaliação dos melanomacrófagos é subjetiva, sendo

necessário um método que compare animais saudáveis da mesma espécie, sexo e estado fisiológico.

Nalguns casos, a hipertrofia melanomacrofágica pode ser marcante, associada a uma atrofia hepatocelular significativa e no exame macroscópico do fígado pode aparecer uma coloração preta (figura 38). Os fatores que podem contribuir para este caso incluem a variação sazonal, a debilidade, o emagrecimento, o stress e a inflamação crónica (Christiansen, Grzybowski et al. 1996; Agius and Roberts 2003). Neste trabalho, a maioria dos casos de aumento dos centros melanomacrofágicos encontrava-se relacionada com a presença de uma infeção crónica de origem bacteriana (figura 22). Finalmente, os centros melanomacrofágicos podem encontrar-se profundamente envolvidos nas doenças bacterianas crónicas, tais como as micobacterioses. Nestes casos observa-se a hipertrofia com o aumento do tamanho de células claras ou não pigmentadas. Neste estudo não se verificou este fenómeno.

Nos quelónios, é frequente a septicémia em animais que apresentam imunossupressão, como resultado de uma invasão de microrganismos presentes no interior da cavidade oral, intestino e cloaca. As bactérias também podem entrar através de feridas ou disseminar-se a partir de um abscesso (por exemplo um abscesso subcutâneo ou auricular). As principais causas de ocorrência desta patologia podem ser no caso de quelónios semiaquáticos, a água com pouca qualidade (quando lá depositadas por muito tempo), métodos de filtração inadequados e áreas de saída de água limitadas; animais submetidos a temperaturas abaixo do intervalo ideal; poucas condições de higiene e no caso de presença de feridas ou lesões abertas, sem tratamento (figura 2) (Innis *et al.* 2008 a).

Nos quelónios semiaquáticos a água é um excelente veículo de infeção por bactérias. Neste estudo alguns dos exemplares observados com septicémia apresentavam feridas abertas ou abscessos cutâneos/subcutâneos (figura 2, 5 e 6), outros não apresentavam alguma anomalia física, no entanto, deduziu-se que estes animais tendo a origem de uma vida de cativeiro possam ter desenvolvido septicémia devido a más condições de alojamento e nutrição.

Os quelónios com septicémia podem apresentar alguns sinais clínicos não específicos, tais como, a debilidade aguda, o eritema no plastrão, as petéquias

hemorrágicas nas mucosas e a morte súbita. Na presença de infeções localizadas deve-se sempre suspeitar de septicémia. Muitas vezes a septicémia é considerada secundária em relação a uma doença crónica (possivelmente não visível) (Innis *et al.* 2008 a).

A partir da cultura de sangue e/ou citologia é possível a identificação dos organismos causadores de septicémia. Do ponto vista hematológico pode-se observar a presença de heterófilos tóxicos e às vezes a presença de bactérias. Estas evidências justificam a aplicação urgente e agressiva de antibioterapia. De forma semelhante as evidências radiográficas de lesões líticas associadas à arterite séptica obrigam a uma resposta rápida com antibióticos, após as amostras bacteriológicas terem sido recolhidas. Contudo, com a cultura e a citologia, os organismos contaminantes podem ser difíceis de distinguir dos patogénicos. As infeções disseminadas (articulações e vísceras) sugerem a ocorrência de uma septicémia anterior. Muitas vezes esta patologia só é identificada *post mortem* ou torna-se um diagnóstico retrospectivo presuntivo, quando se obtém resposta ao tratamento antimicrobiano (Innis *et al.* 2008 a).

Neste estudo concretizaram-se algumas colorações diferenciais de *Gram* e os resultados foram a presença de cocos *Gram* positivos (apresentaram uma coloração roxa).

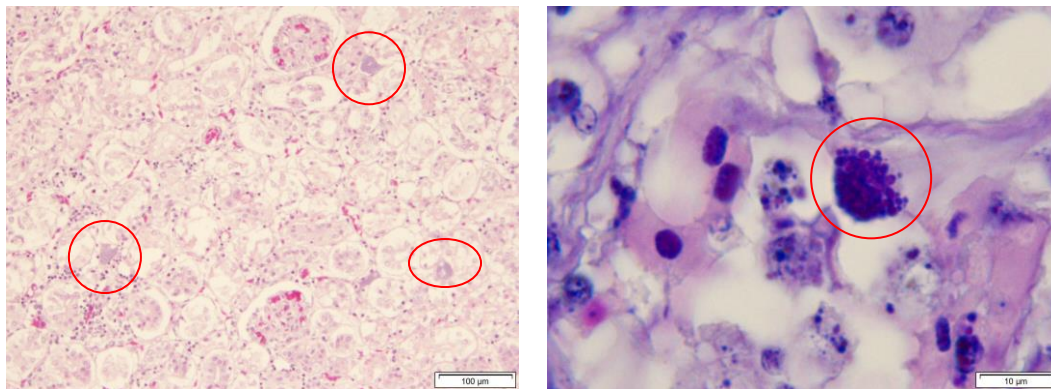


Figura 24 – Rim. (a) Imagem à esquerda – Nefrite intersticial. Pielonefrite. Quelónio. H-E. 100x (b) Imagem à direita – Aglomerado de cocos *Gram* positivos (assinalados com círculo). Quelónio. Coloração *Gram*. 1000x

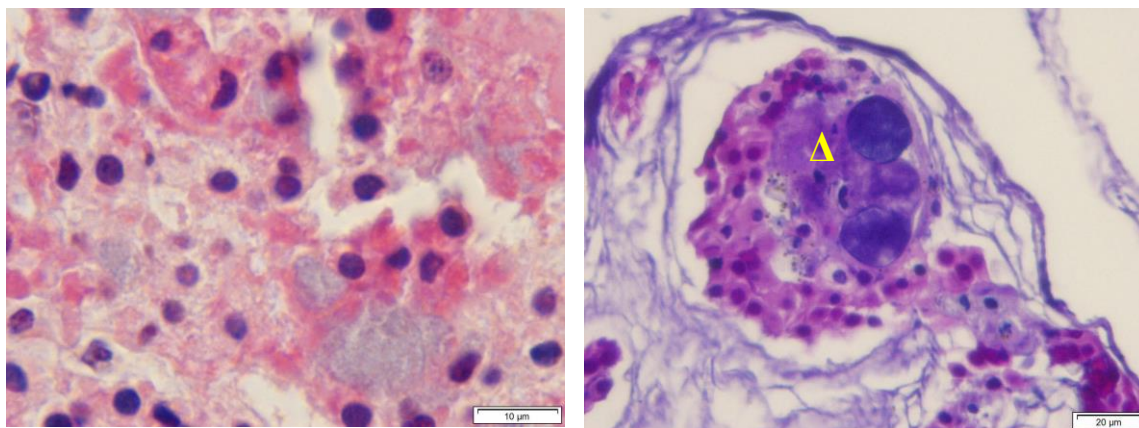


Figura 25 – Pulmão. (a) Imagem à esquerda – Pneumonia bacteriana. Septicémia. Quelónio. H-E. 1000x
(b) Imagem à direita – Colónia bacteriana cocos *Gram* positivos (Δ). Quelónio. *Gram*. 400x

A origem do tipo de agente etiológico na septicémia, normalmente provém da microflora gastrointestinal dos répteis que é constituída frequentemente por bactérias *Gram* negativas e positivas, bactérias aeróbicas e anaeróbicas, bolores e protozoários (Rosenthal and Mader 2006).

Segundo a bibliografia as bactérias *Gram* negativas são os patogénicos mais frequentes (Cooper 1981; Draper, Walker et al. 1981; Jacobson 1984; Ross 1984), devido ao facto da sua presença contínua nos répteis saudáveis (são frequentemente isolados nestes animais) (Johnson and Benson 1996).

As bactérias *Gram* positivas, normalmente são pouco associadas a doenças (Plowman, Montali et al. 1987) e não são consideradas patogénicas, porque são habitantes comuns especialmente da pele. No entanto, algumas deste tipo de bactérias podem causar doença, no caso da *Corynebacterium* sp., do *Staphylococcus* coagulase positivo e do *Streptococcus* beta hemolítico (β -hemolítico). Num estudo sobre um abscesso no fígado da espécie *Gopherus Agassizii* foi isolada a *Corynebacterium* sp. como agente etiológico (Berschauer and Mader 1998). Relativamente aos *Streptococcus* sp. isolados nos répteis, mais de 90% destes são β -hemolíticos e patogénicos (Isaza, Garner et al. 2000).

Num recente estudo de Jesús Peris (2012) sobre o estado sanitário de *Trachemys scripta elegans* e *Testudo hermanni hermanni*, do ponto vista bacteriológico, descobriu a presença de uma variedade de bactérias no pulmão, fígado, baço, rim e intestino. O intestino foi o órgão com maior prevalência de bactérias (65,8%) pelo facto de ser um órgão com uma população microbiótica. O pulmão apresentou uma prevalência de

35,8%, o fígado 27,8%, o baço 18,9% e o rim 15,8%. Neste estudo verificou-se que as populações de cativeiro apresentavam maior percentagem de infeção bacteriana (83,7%) do que as de vida livre (51,6%). As bactérias isoladas neste trabalho, por ordem decrescente, foram: *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase negativo*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus* sp., *Klebsiella*, *Alcaligenes* sp., *Streptococcus* alfa hemolítico, *Vibrio cholerae*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Providencia rettgeri*, *Salmonella* sp., *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter* sp., *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter* sp., *Morganella morganii*, *Pasterella*, *Providencia* sp., *Vibrio mimicus*, *Vibrio* sp., *Actinobacter*, *Citrobacter braakii*, *Escherichia hermannii*, *Streptococcus* beta hemolítico. Assim como descrito anteriormente a maioria das bactérias são *Gram* negativas, apenas o *Staphylococcus coagulase negativo*, o *Streptococcus* alfa hemolítico, o *Streptococcus* sp., a *Actinobacter*, o *Streptococcus* beta hemolítico são bactérias *Gram* positivas (Peris 2012).

Neste trabalho foram executadas colorações de *Gram* nas amostras de tecidos com colónias bacterianas e os resultados revelaram a presença de bactérias cocos *Gram* positivas. De acordo com bibliografia anteriormente descrita colocaram-se as hipóteses de identificação destas bactérias o *Staphylococcus coagulase negativo* ou positivo, o *Streptococcus* alfa hemolítico e o *Streptococcus* beta hemolítico. No entanto o mais correto seria uma análise bacteriológica precisa para estabelecer uma identificação precisa.

Pulmões

Durante o exame macroscópico dos pulmões, verificaram-se casos, onde estes apresentavam uma textura alterada, mais sólida e uma coloração branca. Observou-se também a presença de abscessos com uma coloração branca ou castanha (figura 26 e 27) na porção caudal do pulmão. Neste estudo testemunhou-se casos de lesões unilaterais ou bilaterais. O diagnóstico presuntivo nestes casos foi infeção do trato respiratório inferior/pneumonia. As figuras 26 e 27 indicam alguns exemplos observados durante as necrópsias.

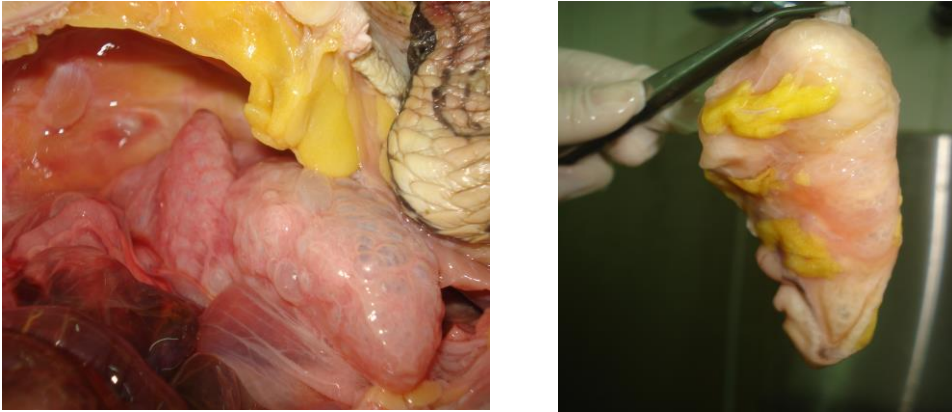


Figura 26 – Alterações macroscópicas de pulmão observadas durante as necrópsias numa tartaruga da Flórida (*Trachemys scripta*).

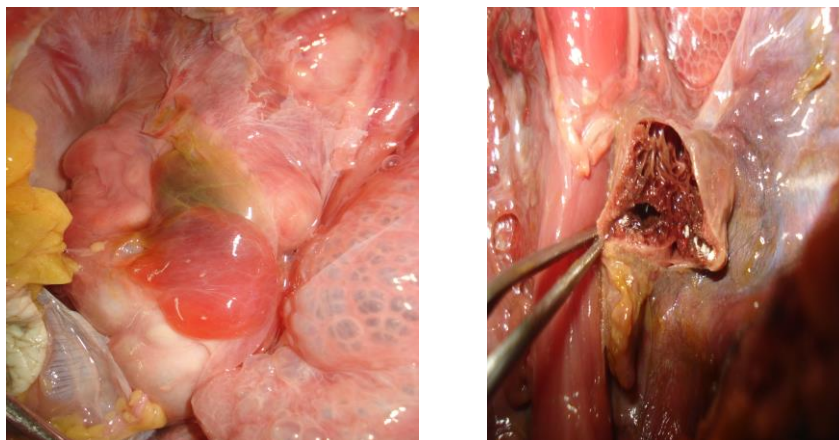


Figura 27 – Alterações macroscópicas de pulmão numa tartaruga da Flórida (*Trachemys scripta*). Abscesso de coloração branca (imagem à esquerda) ou castanha (imagem à direita) na porção caudal do pulmão.

As infeções do trato respiratório inferior são frequentes nos quelónios de cativeiro. Os agentes patogénicos podem ser virais, bacterianos ou micóticos. Também podem ocorrer infeções com mais do que um agente patogénico (infeções concomitantes) (Innis *et al.* 2008 b). Os sinais clínicos não se encontram presentes ou muitas vezes não são específicos. Ao longo do tempo a infeção do trato respiratório inferior evolui, torna-se evidente, estabiliza e acaba por ser difícil de resolver. Nesta fase, os animais apresentam sinais de pneumonia que podem ser: postura ortopneica (pescoço estendido e boca aberta), movimentos respiratórios amplificados, dispneia inspiratória e/ou expiratória, taquipneia (especialmente em repouso), aumento dos sons respiratórios (aumento dos murmúrios), sons respiratórios anormais (estertores), inatividade, anorexia, letargia e presença de doenças concomitantes (Innis *et al.* 2008 b).

A descarga nasal pode ou não estar associada à pneumonia, no entanto a presença da mesma normalmente é mais indicativa de uma doença no interior das vias respiratórias superiores ou da cavidade oral (Murray 2006). Os animais com pneumonia frequentemente encontram-se doentes a nível sistémico. Na figura 26 observa-se um exemplar com pneumonia bacteriana e também com sinais de septicémia. Nas tartarugas aquáticas, as pneumonias unilaterais muitas vezes resultam numa assimetria durante a natação, apresentando o lado afetado submerso na água.

Neste trabalho verificou-se que as tartarugas necropsiadas não apresentaram sinais clínicos relevantes, apenas surgiu a morte súbita.

A pneumonia apresenta múltiplas etiologias que podem causar facilmente a morte do animal se não for aplicada uma terapêutica agressiva. Embora exista um grande número de agentes infecciosos que podem causar pneumonia, muitos dos casos clínicos de tartarugas de cativeiro resultam de condições deficientes no alojamento, na higiene e na nutrição (Murray 2006). Como já foi mencionado anteriormente, as tartarugas deste estudo eram de cativeiro antes de serem libertadas no meio selvagem e em virtude de terem capacidade de sobreviver em meios anaeróbicos, pressupõe-se que podiam ser portadoras de pneumonia desde essa altura ou posteriormente, não descurando o risco de contágio para as espécies autóctones.

Na literatura encontram-se descritos alguns fatores predisponentes nos animais de cativeiro que podem ser adaptados às tartarugas deste estudo. Os fatores podem ser episódios de endoparasitismo ou ectoparasitismo grave, de má nutrição (hipovitaminose A ou deficiência de proteínas) e más condições de temperatura. Outros fatores de menor importância são o conhecimento da aplicação de quarentena, o tipo de coleção de répteis, a presença de outros répteis, o tipo e frequência de desinfeção do ambiente e a evolução dos sinais clínicos (Murray 2006; Innis *et al.* 2008 c). Segundo o raciocínio descrito anteriormente, nas tartarugas recolhidas do meio selvagem o mais relevante é o registo de dados sobre o ambiente, os alimentos disponíveis e a existência de outros répteis.

O diagnóstico nos animais de cativeiro é realizado a partir do exame clínico e a confirmação normalmente é feita após a execução das técnicas de imagiologia combinadas com citologia, cultura ou histopatologia da lesão. As seguintes técnicas de investigação para o diagnóstico de pneumonia podem ser a hematologia e bioquímicas,

a lavagem pulmonar trans-traqueal, pré-cutânea ou trans-carapacial, a citologia, a cultura microbiológica, a radiografia (especialmente a projeção craniocaudal), a tomografia computadorizada e a ressonância magnética (consideradas as melhores técnicas de imagiologia para localizar a lesão) (Divers and Lawton 2000), a endoscopia traqueal/pulmonar (exame que providencia a melhor determinação de um diagnóstico definitivo nos pulmões), o isolamento de vírus e a microscopia eletrônica.

Muitos dos agentes infecciosos que causam pneumonia nos répteis induzem uma resposta granulomatosa (figura 18), por este motivo o líquido recolhido numa lavagem nem sempre pode estar em contato com os organismos patogénicos, mas sim, com os granulomas (Murray 2006).

Neste trabalho, a partir da análise histopatológica, estabeleceu-se o diagnóstico de pneumonia nos casos representados pelas figuras 18, 25 e 28.

A nível de literatura sobre casos de vírus no trato respiratório encontra-se descrita a presença de inclusões corporais e de células gigantes em tartarugas terrestres e marinhas como suspeita de infeção herpesvírus e iridovírus (Pettan-Brewer, Drew et al. 1996; Westhouse, Jacobson et al. 1996). Neste estudo não se verificou esta alteração microscópica, no entanto identificaram-se alguns casos de pneumonia de origem bacteriana (descritos anteriormente).

A maioria dos casos de pneumonias diagnosticadas tem origem em infeções bacterianas que podem ser focais, unilaterais ou bilaterais. Muitas dessas bactérias isoladas são organismos *Gram* negativos, os quais podem ser identificados clinicamente nos animais saudáveis (Murray 2006). A pneumonia bacteriana pode ocorrer como entidade primária ou como resultado de uma dispersão de outro tipo de doença, como por exemplo a estomatite infecciosa e pode também ser a consequência de um estabelecimento de bactérias comensais num local não apropriado (porção caudal dos pulmões) (Murray 2006).

Nas amostras de pulmão, de acordo com o resultado positivo das colorações de *Gram* realizadas, constatou-se as mesmas hipóteses de identificação do tipo de bactérias descritas nos casos de septicémia. No entanto, segundo a literatura refere a *Escherichia coli*, a *Klebsiella* spp., as *Pseudomonas* spp., o *Proteus* spp. e as *Aeromonas* spp. como potenciais agentes patogénicos que podem ser recolhidos com frequência nas fontes de água dos ambientes dos répteis (Hilf, Wagner et al. 1990). A *Pasteurella testudinis* tem

sido descrita em casos de pneumonia nas tartarugas terrestres do deserto (*Gopherus agassizii*) e a *Mycoplasma agassizii* nas tartarugas *Gopherus agassizii* e *Gopherus polyphemus*. Esta última bactéria parece estar diretamente envolvida com o complexo de doença respiratória superior destas espécies (Mader 1991; Jacobson and al 2000). As bactérias *Mycoplasma* spp. e *Chlamydophila* spp. (mais frequentes) têm sido associadas às pneumonias dos répteis, principalmente a *Mycoplasma* spp. em diversas espécies de quelônios. A *Mycobacterium* spp. também pode causar pneumonia, no entanto a maioria dos casos de infecções granulomatosas não afetam o trato respiratório como local primário. A pneumonia surge como consequência de outro local de infecção (Murray 2006). A *Chlamydophyla* spp., apesar de originar uma infecção sistêmica, pode também apresentar sinais respiratórios e de pneumonia.

Quanto às alterações microscópicas de pulmão, para além dos casos de pneumonia bacteriana descritos anteriormente, constatou-se outro tipo de patologia. Conforme ilustrado na figura 28, observou-se nesta lâmina uma infiltração por fungos no lúmen de *faveolae/ediculae*. Verificou-se também a presença de uma infiltração por células inflamatórias rodeando as hifas septadas, indicando uma pneumonia micótica de caráter crônico.

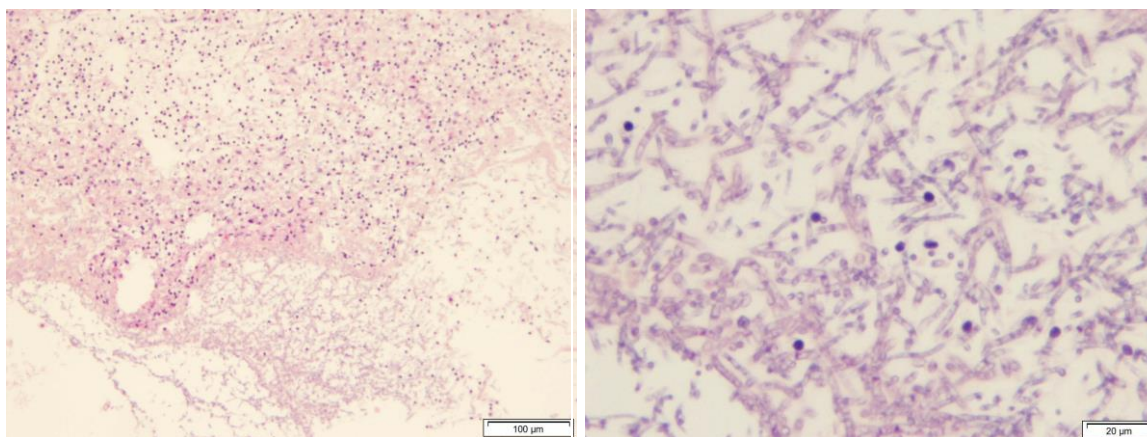


Figura 28 – Pulmão. Pneumonia micótica. Quelônio (Tartaruga da Flórida - *Trachemys scripta*). H-E. 100x e 400x

Neste exemplar recorreu-se à coloração diferencial PAS e, conforme explicitado na figura 29, o resultado foi positivo, as hifas coraram de vermelho, indicando a presença de fungos.

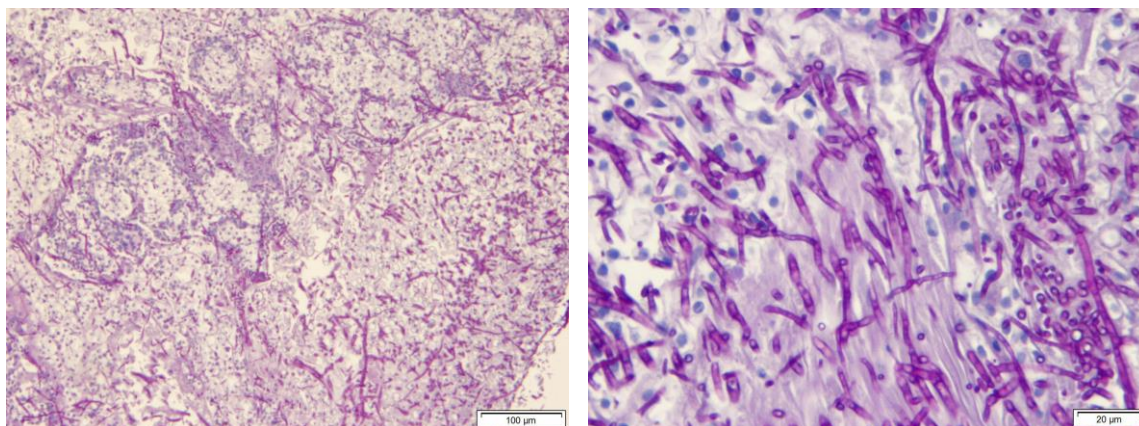


Figura 29 – Pulmão. Pneumonia micótica. Quelônio. PAS. 100x e 400x

No entanto, também se optou pela coloração diferencial *Grocott* e o resultado foi positivo, representado na figura 30, as hifas apresentaram uma coloração verde com a parede corada de preto, indicando a presença de fungos.

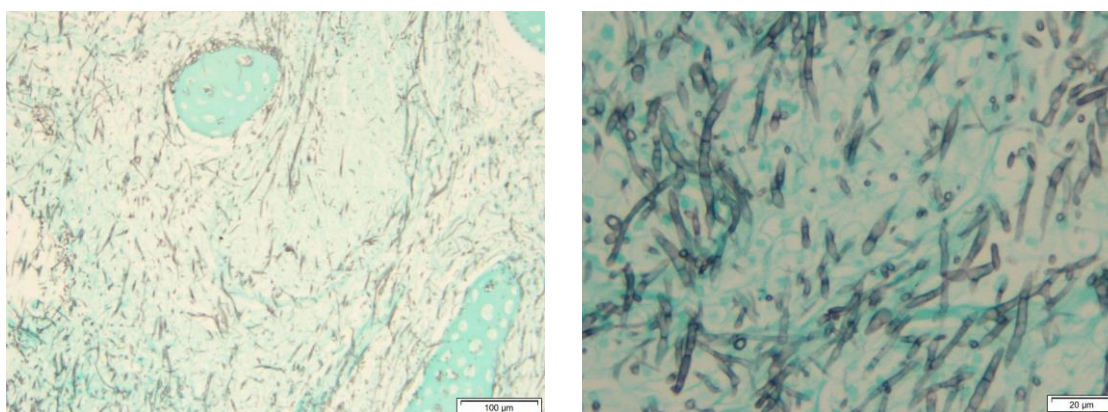


Figura 30 – Pulmão. Pneumonia micótica. Quelônio. *Grocott*. 100x e 400x

Nos répteis de cativeiro, as pneumonias micóticas são ocasionais e o seu diagnóstico é pouco comum. Quando ocorrem alterações nas condições ambientais e nutricionais, altera-se a capacidade do sistema imunitário do animal e resulta numa infecção fúngica (organismos ubíquos na natureza), devido à exposição do mesmo a esporos fúngicos num estado de imunossupressão. Alguns casos foram relatados devido ao uso excessivo de antibióticos. A temperatura parece ser um fator crucial no desenvolvimento de pneumonia fúngica (Murray 2006).

O diagnóstico da pneumonia fúngica é muitas vezes difícil de realizar *ante mortem*. A recolha de elementos fúngicos, hifas/esporos ou de agentes fúngicos na cultura, partindo da lavagem transtraqueal, é um dos meios de diagnóstico que podem permitir a confirmação de pneumonia fúngica. Como muitas infecções fúngicas nos

pulmões estimulam a formação de granulomas focais ou difusos, a identificação a partir do raio-x desses nódulos pulmonares é sugestivo a uma infecção micótica. Normalmente, o diagnóstico de pneumonia fúngica é realizado no exame *post mortem* e as alterações patológicas macroscópicas incluem a presença de granulomas pulmonares, a consolidação do pulmão (figura 27) e por vezes a extensão da infecção aos órgãos adjacentes. Infelizmente, a maioria dos tratamentos para pneumonias fúngicas não têm tido sucesso (Murray 2006).

No que diz respeito ao tipo de fungos, existem vários que são comensais e patogénicos, e que têm sido isolados nos répteis (Austwick and Keymer 1981). O sistema respiratório, o intestino, a pele e o tecido subcutâneo estão muitas vezes envolvidos, embora a micose possa ser observada noutras vísceras (Innis *et al.* 2008 c).

O número de espécies de fungos associados à pneumonia nos répteis inclui *Mucor*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Chrysosporium*, *Beauveria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Paecilomyces* e vários *Phycomycetes* (Fromtling, Kosanke *et al.* 1979; Migaki, Jacobson *et al.* 1984; Junge and Miller 1992; Jacobson, Cheatwood *et al.* 2000). Nos quelónios o *Aspergillus* é o mais frequente e normalmente caracteriza-se por hifas ramificadas e septadas (Jacobson 1997). Heard (1986) descreveu um caso de hialohifomicoses na tartaruga *Dipsochelys elephanina* (Heard, Cantor *et al.* 1986). As hialohifomicoses são consideradas infecções oportunistas causadas pelos fungos não pigmentados, tais como o *Aspergillus*, caracterizado pelas hifas septadas e hialinas.

As leveduras mais frequentemente isoladas são a *Candida*, o *Torulopsis*, o *Rhodotolara* e o *Tricosporum* (Kostka, Hoffmann *et al.* 1997). Estas leveduras são mais frequentes nos quelónios herbívoros. Os fungos que são isolados a partir de locais não estéreis não devem ser necessariamente considerados como patogénicos. O isolamento a partir de cultura destes organismos é frequente, no entanto as evidências citológicas e histopatológicas são menos frequentes. As doenças fúngicas parecem ser pouco frequentes em animais selvagens e podem estar intimamente relacionadas com o ambiente de cativeiro (Jacobson 1994).

Rim

O autor Jacobson (1994) descreveu alguns casos de doença renal nos quelónios, baseados na avaliação das necrópsias (Jacobson 1994). Keymer (1978 a e b) descreveu

que de 144 necrópsias a tartarugas terrestres, 4,9% apresentavam nefropatias e das 122 necrópsias realizadas em tartarugas de água doce e marinhas, 11,5% apresentavam nefropatias (Keymer 1978 a; Keymer 1978 b). A ausência de literatura a descrever insuficiência renal e possíveis causas da patologia, é uma consequência da incapacidade de diagnosticar a doença renal *ante mortem*, o que não indica que a prevalência da patologia seja baixa. Neste estudo, das 42 necrópsias de tartarugas semiaquáticas, 29% apresentaram nefropatias.

Os possíveis fatores predisponentes da doença renal podem ser a desidratação, o tipo de medicamento, parasitas, vírus, bactérias, o tipo de dieta e, por último, o hiperparatiroidismo (Innis et al. 2008 c).

A desidratação pode provocar doença renal por precipitação, aumentando assim a incidência de problemas renais. Segundo um estudo de Cooper e Jackson (1981), estes descrevem que os répteis que morrem à fome e desidratados, muitas vezes apresentam os túbulos completamente preenchidos por material cristalino, o que resulta numa obstrução tubular renal (Cooper and Jackson 1981). Este fenómeno acontece devido à excreção ativa de uratos durante a desidratação, causando uma insuficiência renal. Portanto, nos casos de desidratação, nos quelônios que apresentam doença renal crónica e que recebem medicação ou se encontram sob anestesia é fundamental manter uma taxa adequada de infusão de fluidos. Este fator ajuda a preservar a função renal, a manter a osmolaridade plasmática, previne a hiperuricémia e a gota, assim como também aumenta a excreção e o metabolismo das toxinas, dos anestésicos e outros medicamentos excretados pelo rim. A fluidoterapia pode envolver o uso de tubos gástricos e esofágicos (tubos esofagotomia), fluídos intracelómicos, intraósseos, intravenosos e via epicelómica.

Do ponto vista parasitológico, os autores Zwart e Truyens (1975) descreveram a infecção *Hexamita parva* (Zwart and Truyens 1975) no rim. Este parasita tem sido reportado em espécies como *Testudo*, *Geochelone*, *Cuora*, *Terrapene*, *Geoemyda* e *Clemmys* e pode provocar uma nefrite, podendo o hospedeiro correr risco de morte. É necessário diferenciar a *Hexamita parva* das *Trichomonas* intestinais, pois a sua presença nas fezes e na urina é normal.

Quanto ao tipo de medicamentos, existem várias drogas que são nefrotóxicas, especialmente os aminoglicosídeos (gentamicina, amicacina e canamicina). O autor

Frye (1991) sugere que se deve evitar ao máximo o uso destes agentes na maioria dos répteis e apenas utilizá-los se forem os únicos antimicrobianos selecionados no teste de sensibilidade (Frye 1991 a).

Do ponto vista virológico, não existem casos descritos de doenças virais que resultem numa só patologia renal, contudo, é possível a mesma encontrar-se combinada com outra doença sistémica. O autor Muller (1990) investigou um surto de doença associada ao herpesvírus, onde observou corpos de inclusão nos tecidos glomerulares. O autor sugere que a excreção renal e a transmissão horizontal do vírus podem ocorrer (Müller, Sachsse et al. 1990). O autor McArthur (2001) descreve a infiltração linfóide de muitos órgãos, incluindo do fígado, baço, pulmões e rins, na presença de partículas de herpesvírus (McArthur 2001).

Relativamente aos casos de bactérias, qualquer microrganismo isolado numa infeção renal pode também apresentar-se noutras áreas do corpo. Estes tipos de infeções disseminadas podem surgir em casos de doença nutricional crónica, doença viral ou a partir de um simples granuloma ou abscesso no tecido renal.

Vários tipos de bactérias e fungos podem ser isolados no caso de pielonefrite, mas nenhum é específico da doença renal. O sistema porta-renal dos répteis (Holz, Barker et al. 1994; Holz 1999 b) pode permitir a infeção dos rins a partir da disseminação por via hematológica de infeções com origem na cauda dos quelónios. A pielonefrite também pode resultar de uma infeção ascendente do trato urinário (Frye 1991 a).

De acordo com o contexto anterior, sugere-se que qualquer foco de infeção presente no organismo do animal pode conduzir ao desenvolvimento de uma doença renal. Neste trabalho observou-se casos de infeção renal bacteriana, representados nas figuras 10, 12, 24 e 25, nos quais o microrganismo encontrava-se disseminado noutros órgãos. Alguns dos casos de infeção disseminada sugere-se que foi a partir da existência de um abscesso cutâneo ou subcutâneo.

Relativamente ao tipo de dieta, existe uma evidência caricata onde se refere que algumas dietas podem precipitar a ocorrência de uma insuficiência renal nos répteis. As dietas com excesso de purina e com níveis de proteínas elevados ou com proteína animal significativa são inapropriadas para os quelónios herbívoros. Os níveis elevados

de purina podem predispor a hiperuricemia em qualquer réptil e o melhor é ser evitada (Innis *et al.* 2008 c).

O crescimento acelerado, a carapaça mole e outras manifestações de doenças ósseas metabólicas nos quelônios adolescentes parecem estar indiretamente associadas à insuficiência renal (Innis *et al.* 2008 c). O hiperparatiroidismo parece predispor à doença renal (Slatopolsky, Martin *et al.* 1980; Endlich, Massfelder *et al.* 1995; Nami and Gennari 1995; Rosol, Chew *et al.* 1995; Nagode, Chew *et al.* 1996). Na doença renal os sinais clínicos não são específicos e podem incluir a inatividade, a fraqueza, a debilidade e a anorexia. Quanto à libertação de urina (*output* urinário), a doença renal pode ser caracterizada pela presença de anúria, oligúria ou poliúria. Do ponto vista clínico, estas alterações são difíceis ou impossíveis de detetar, porque a urina vinda do urodeu é misturada nas fezes no interior do proctodeu e cólon. A libertação de urina depende também de fatores externos, tais como a ingestão de água, a quantidade de água nos alimentos, a humidade ambiental e os banhos. Os animais com azotemia pré-renal (hiperuricemia/uremia) podem ocasionalmente demonstrar sinais clínicos de desidratação, tais como, elasticidade da pele reduzida, diminuição de *output* urinário e presença de olhos secos. No entanto, a desidratação não é específica da doença renal e não é um achado invariável. A hipoproteinémia pode surgir devido a uma nefropatia por perda de proteína e originar edema generalizado. No entanto, ocorre frequentemente edema generalizado nos casos em que se aplica fluidoterapia nos animais durante a doença renal, principalmente nas espécies uricotélicas desidratadas, onde os túbulos e glomérulos se encontram obstruídos com depósitos de urato (Innis *et al.* 2008 c).

Quanto à história clínica, segundo a literatura, nas tartarugas de cativeiro o aparecimento dos sinais clínicos, descritos anteriormente, pode estar relacionado com o tipo de dieta, de alojamento ou doença infecciosa. Outros aspetos específicos de interesse para a anamnese incluem a administração de medicamentos nefrotóxicos, a exposição a possíveis nefrotoxinas naturais (ex. ingestão de plantas tóxicas ou acesso a fontes de água contaminadas ou de qualidade precária), a pouca ingestão de fluidos ou falha no fornecimento de água, o manejo da hibernação inadequado ou manejo pós hibernação inadequado, o fornecimento de dietas ricas em proteínas, a suplementação excessiva de vitamina D3 ou pobre em vitamina A e a exposição a animais infetados por agentes infecciosos (por exemplo das vias aéreas) (Innis *et al.* 2008 c). Como as tartarugas

estudadas ao longo deste trabalho eram oriundas da vida selvagem, não foi possível obter a sua história clínica e a maioria não revelou os sinais clínicos descritos anteriormente.

O diagnóstico *ante mortem* da doença renal é complexo e muitas vezes depende da associação de vários achados. Existem razões fisiológicas e práticas que justificam a incapacidade de desenvolver testes de avaliação da função renal nos quelônios. Esses métodos tais como, a taxa de *clearance* utilizada na medicina dos mamíferos, não são aplicáveis nos quelônios devido às escassas alterações do trato urinário sobre a composição da urina.

O diagnóstico de pielonefrite *ante mortem* de tartarugas terrestres é impossível sem o auxílio da biópsia, a partir da endoscopia ou como achado acidental feito na celiotomia. Contudo, aglomerados de células renais e heterofilia com ou sem monocitose ou azurofilia podem estar presentes e elevações variáveis de aspartato aminotransferase (*aspartate aminotransferase* - AST), lactato desidrogenase (*lactate dehydrogenase* - LDH), ácido úrico e potássio, também podem ocorrer. A pielonefrite é frequentemente diagnosticada a partir da histopatologia de amostras *post mortem*, assim como ocorreu neste estudo (McArthur, 2008).

O diagnóstico de hexamitíases em quelônios vivos é complexo, porque as *Trichomonas* podem estar presentes na urina de animais saudáveis e é necessária uma biópsia renal para associar o protozoário à sua patologia. Os achados na microscopia do sangue e da urina podem apenas ser sugestões (McArthur, 2008).

Relativamente às bioquímicas sanguíneas, nenhum critério bioquímico pode ser relacionado como medida de função renal inequívoca. A combinação de parâmetros mensurados parece fornecer pouco progresso em relação à sensibilidade e especificidade na avaliação de doença renal. Os níveis sanguíneos de ureia, ácido úrico, creatinina, enzimas (AST/LDH), albumina, eletrólitos, incluindo o potássio, cálcio e fósforo, o *ratio* sanguíneo de cálcio e fósforo inorgânico têm sido citados na literatura para avaliar a doença renal nos répteis. Contudo, nos quelônios nenhuma destas variações se relacionam diretamente com a doença renal (McArthur, 2008).

A mensuração do ácido úrico não é uma avaliação fiável para a doença renal, pois os valores nos quelônios saudáveis podem variar com a espécie, as condições ambientais, a estação do ano e o género. A hiperuricémia encontra-se presente nos casos

de desidratação, de fornecimento de dietas ricas em proteínas e na doença renal. Os níveis de ureia sanguíneos são limitados quanto à avaliação da função renal (Innis et al. 2008 c). O aumento do nível de ureia resulta nos casos de desidratação, catabolismo, doença renal ou na combinação destes fatores. Na maioria dos répteis a variação na produção e excreção da creatinina limita a interpretação dos níveis plasmáticos em relação à patologia. A hipoalbuminémia foi encontrada em tartarugas terrestres numa fase final da doença renal. Nos casos de doença glomerular existe uma perda excessiva de albumina, no entanto não se considera uma característica específica, devido ao facto de se encontrar diminuída nos casos de hepatopatias, enteropatias por perda proteica e nos períodos de fome. Nas fêmeas, a albumina pode estar aumentada durante a vitelogénese, tal como os níveis de cálcio sérico (Innis et al. 2008 c). A hipercalcémia foi observada nalguns casos de tartarugas desidratadas. Esta alteração pode ser provavelmente o resultado de diminuição da excreção ao nível da bexiga, ou seja falha na entrada da urina, devido à diminuição da filtração glomerular. O aumento dos níveis de potássio sérico pode também ser devido a uma lesão tecidual grave ou à hemólise das células sanguíneas. No caso de insuficiência renal nos grandes vertebrados, os níveis sanguíneos de cálcio podem variar (hipocalcémia, normocalcémia e hipercalcémia), o mesmo acontece no caso dos quelónios (Feldman 1995). O cálcio sanguíneo pode ser afetado por uma variedade de fatores *in vivo* e *in vitro* (foliculogénese, excesso de suplementação hipervitaminose D, lipemia, concentração de albumina, linfodiluição e hemólise) que podem ocultar qualquer variação causada pela função renal. Nos quelónios de cativeiro o fosfato inorgânico é afetado significativamente pelo tipo de dieta, suplementação de vitaminas e minerais. A hormona paratiroide mantém os níveis de cálcio sanguíneo de acordo com os de fosfato e a sua influência pode mascarar qualquer alteração na função renal (Innis et al. 2008 c). O *ratio* cálcio/fosfato inorgânico é afetado por fatores individuais, tais como, alojamento, nutrição, vitaminas, idade, género, estação do ano e doença renal, que por sua vez influencia os níveis de cálcio e de fosfato inorgânico plasmático. As enzimas, tais como a LDH, a gama-glutamyl transpeptidase (*gamma-glutamyl transpeptidase* - GGT), a alanina aminotransferase (*alanine aminotransferase* - ALT) e a AST foram encontradas no tecido renal, assim como noutros tecidos (Ramsay and Dotson 1995). Devido a este fato e destas variarem entre as espécies, não são consideradas específicas para a avaliação da

função renal, no entanto, é necessário uma investigação ao nível de isoenzimas. Nos casos de insuficiência renal crónica, segundo o autor Stuart (2008), os valores LDH e AST têm sido elevados, a oscilação das alterações das mesmas enzimas parece estar relacionada com o nível alto de ácido úrico (Innis et al. 2008 c).

A gravidade específica e o pH da urina podem ser medidas sensíveis apenas para os herbívoros uricotélicos. A recolha de urina dos répteis por cistocentese não é estéril e a nível de microscopia da urina e da citologia podem observar-se eritrócitos, leucócitos e outras células inflamatórias, assim como aglomerados de células renais (*clusters*). Estes aglomerados podem indicar tubulonefrose ou podem conter bactérias ou fungos, sugerindo pielonefrite. Os patogénicos bacterianos e fúngicos podem ser cultivados. Os parasitas *Hexamita* também podem estar presentes na microscopia urinária ou citologia.

Do ponto de vista de imagiologia, o raio-x, a endoscopia, a ressonância magnética e a ecografia podem sugerir gota renal e outras lesões ou patologias. A pielonefrite pode causar um aumento significativo do tamanho do rim afetado e o autor Frye (1991) sugere que esta observação pode dar uma falsa impressão de neoplasia (Frye 1991 a). A maioria das patologias renais, tais como a tubulonefrose, a nefrite, a nefrocalcinose, a glomerulonefrite, a hexamitíase, a amiloidose e a neoplasia requer uma biópsia renal ou necrópsia e histopatologia (ou microscopia eletrónica para estabelecer um diagnóstico (Innis et al. 2008 c).

Para além dos casos de pielonefrite descritos anteriormente, surgiram alguns casos, representados nas figuras 31 e 32, de enfarte renal e necrose glomerular.

Na figura 31, neste exemplar observou-se alguma hemorragia, infiltração por células inflamatórias (i) e a presença de trombos arteriais (t) perto de áreas onde ocorreu enfarte. A existência de trombos arteriais resultou na necrose glomerular por isquemia.

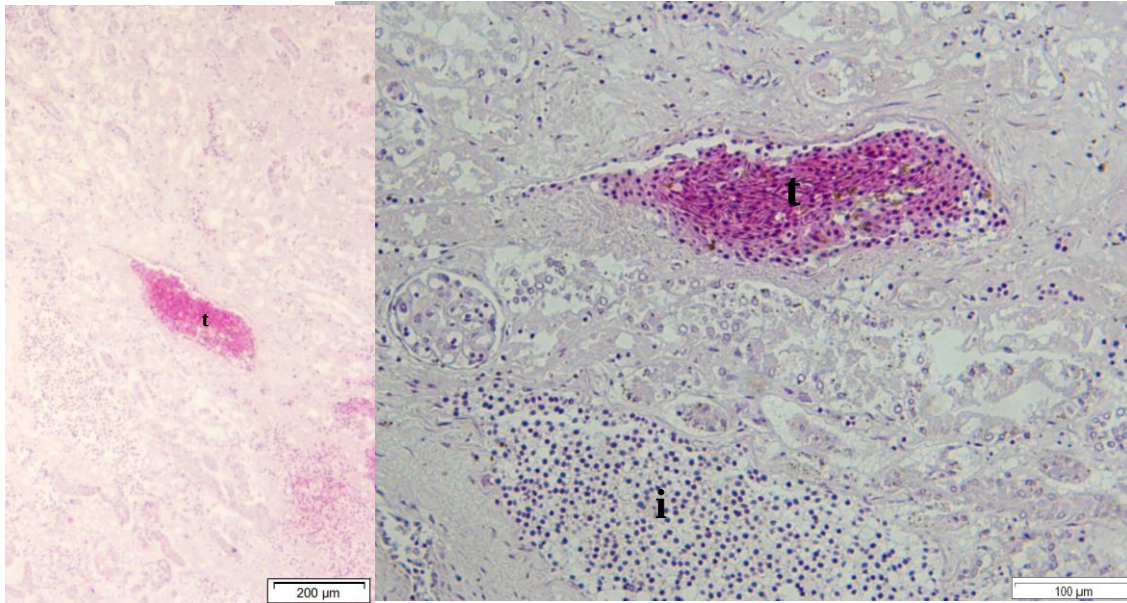


Figura 31 – Rim. Trombo arterial (t) – Enfarte. Quelônio. H-E. 40x e 100x

A figura 32 representa a consequência de uma interrupção da perfusão sanguínea no tecido renal, observando-se a necrose glomerular (g). Neste exemplar verificou-se a ausência de infiltração por células inflamatórias e a presença de algumas colônias bacterianas.

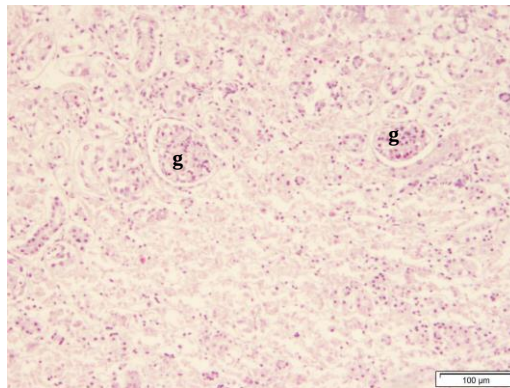


Figura 32 – Rim. Necrose glomerular. Quelônio. H-E. 100x

Nestes dois últimos exemplares verificou-se que o epitélio tubular se apresentava normal. De acordo com a anatomia e a fisiologia do sistema urinário, descrita anteriormente, nos casos de desidratação grave a taxa de filtração glomerular diminui sob o efeito da arginina vasopressina que induz a vasoconstrição da arteríola aferente. Como consequência de um bloqueio total o resultado pode ser o encerramento do glomérulo, o colapso do túbulo e o fim do transporte de sangue ao longo do epitélio tubular (Schmidt - Nielsen and Davies 1968). O bloqueio do fluxo sanguíneo para o interior do glomérulo implica o risco das células tubulares sofrerem necrose isquêmica,

no entanto o sangue do sistema porta renal continua a manter as células vivas (Holz 2006). Assim sendo, de acordo com o contexto anterior, concluiu-se sobre a razão das células tubulares se apresentarem intactas, no entanto, não se descobriram as causas da interrupção da perfusão sanguínea do rim. As hipóteses sugeridas foram a desidratação grave e prolongada, septicemia ou simplesmente a aplicação de eutanásia. O efeito prolongado do bloqueio da perfusão sanguínea originou a necrose das células glomerulares.

Outras alterações microscópicas nas amostras de rim, representadas nas figuras 33 e 34, foram os corpos hialinos intracitoplasmáticos e os cilindros hialinos.

Conforme ilustrado na figura 33, observou-se a presença de inclusões hialinas no interior do citoplasma das células tubulares. Nestes casos suspeitou-se que estes corpos hialinos poderiam ser acumulações de proteínas intracitoplasmáticas.

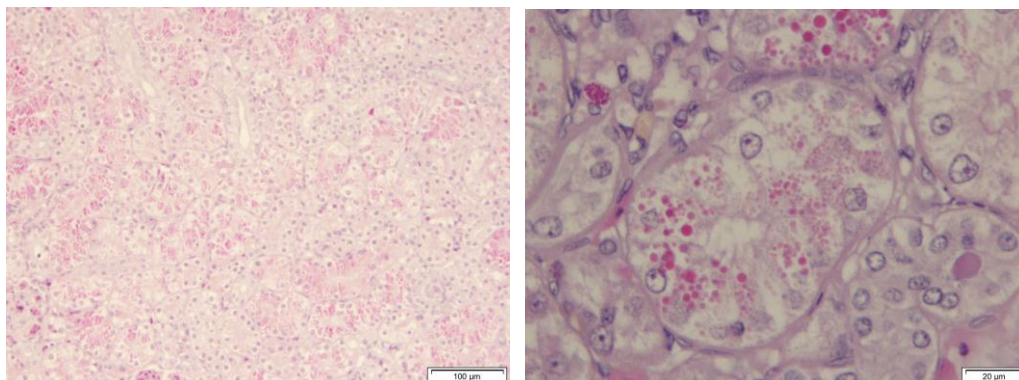


Figura 33 – Rim. Corpos hialinos intracitoplasmáticos. Quelônio. H-E. 100x e 400x

Para além dos corpos hialinos intracitoplasmáticos, representado na figura 33 e 34, visualizou-se no lúmen dos túbulos renais e no ducto coletor a presença de material hialino, acidófilo, homogêneo, amorfo designado por cilindro hialino (c).

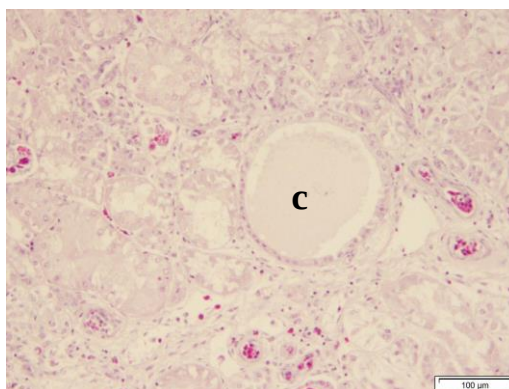


Figura 34 – Rim. Cilindro hialino no ducto coletor. Quelônio. H-E. 100x

De acordo com a literatura esta substância hialina pode ser material proteico, pois nalgumas espécies o rim secreta substâncias mucoides que contêm glicoproteínas ou mucopolissacáridos que ajudam à formação de esferas de ácido úrico e previnem a acumulação das mesmas nos ductos coletores. Consequentemente, a urina uretral dos répteis contém uma grande quantidade de proteínas ao contrário dos mamíferos (não apresentam proteínas na urina). No entanto, o animal não perde a proteína, esta é reabsorvida no reto (Holz 2006).

Bexiga

Dentro do contexto de alterações macroscópicas de bexiga, conforme observado na figura 35, durante as necrópsias observaram-se bexigas com parede espessada e algumas com um conteúdo branco ou fecal no seu interior. Também se visualizou um caso de uma bexiga com um ovo no seu interior e um caso com vasos sanguíneos congestionados na parede (o normal é não apresentarem).

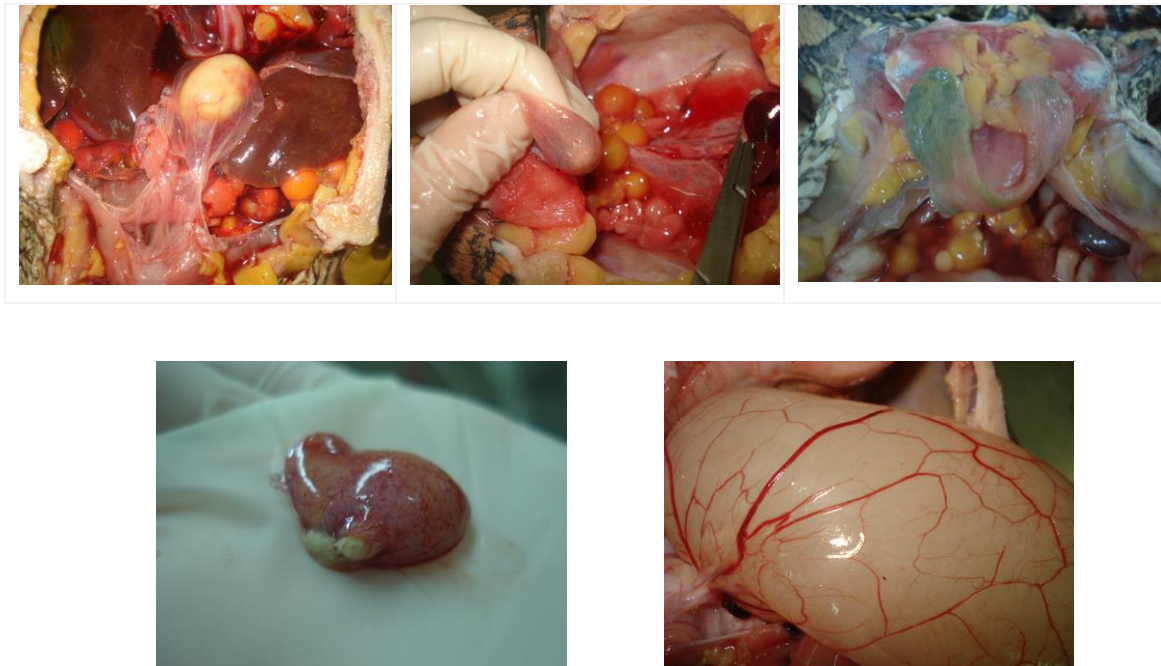


Figura 35 – Alterações macroscópicas de bexiga observadas durante as necrópsias.

Nestas amostras, representadas pela figura 36, observou-se ausência de mucosa e presença de um conteúdo branco no interior do lúmen. O conteúdo branco era constituído por células grandes que possivelmente poderiam ser fungos ou cristais. O

tamanho destas células não correspondia ao de bactérias. Realizou-se a coloração diferencial PAS e *Grocott* e o resultado foi negativo. Segundo a coloração PAS para ser fungos as células deveriam ficar vermelhas e segundo *Grocott* deveriam ter ficado corados de verde com parede preta. Nestes casos suspeitou-se da presença de cristais.

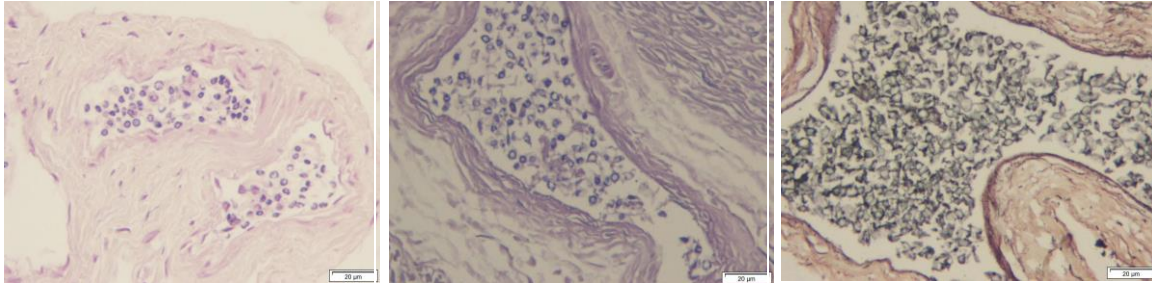


Figura 36 – (a) Imagem à esquerda – Bexiga. Cristais. Quelônio. H-E. 400x (b) Imagem centro – Bexiga. Cristais. Quelônio. PAS 400x (c) Imagem à direita – Bexiga. Suspeita da presença de cristais. Quelônio. *Grocott*. 400x

De acordo com a literatura, a bexiga dos quelônios pode apresentar cristais no seu interior, sendo este fenómeno exacerbado num caso de desidratação. Segundo alguns autores a parede da bexiga é constituída por células ciliadas (epitélio transicional) que secretam muco, facilitando a eliminação dos cristais (Jacobson 2007; McArthur 2008 d).

Relativamente ao caso do ovo no interior da bexiga, representado na figura 35, segundo a anatomia dos quelônios descrita anteriormente, este acontecimento pode ocorrer como resultado de uma migração não fisiológica. Segundo alguns autores, têm sido identificados ovos no interior da bexiga (Frye 1991 b; Thomas, Willer et al. 2002) e estes casos são de carácter urgente, necessitando de uma intervenção cirúrgica (DeNARDO 2006).

A carapaça dos quelônios dificulta a remoção cirúrgica de ovos por via plastrão comparativamente às outras espécies de répteis. Ao contrário das cobras e lagartos, a recuperação da tartaruga após a cirurgia é lenta, requer mais tempo (vários dias) antes do animal exibir comportamentos normais. Outra alternativa de acesso cirúrgico é a partir da fossa inguinal (cranial ao fémur) (Brannian 1984; Page 1985). Neste procedimento o acesso da cavidade celômica é limitado, tornando difícil a remoção de ovos, no entanto, este acesso de tecidos moles cura-se em pouco tempo (DeNARDO 2006).

Fígado

Ao longo deste estudo observaram-se muitos exemplares de tartarugas com alterações macroscópicas no fígado (69%). A maioria apresentava uma coloração amarela, textura friável, bordos redondos e alguma pigmentação negra (figura 37, 38 e 39). Segundo o estudo de Innis (2008) esta alteração macroscópica é frequente nas necrópsias de quelônios e segundo Peris (2012) apareceram mais casos de tartarugas de vida livre com fígado ictérico ou gordo do que as de vida de cativeiro (Innis 2008; Peris 2012). No presente trabalho registou-se que a maioria das tartarugas capturadas nos rios apresentara esta alteração, assim como as tartarugas doadas por particulares, com vida de cativeiro. Do ponto vista histopatológico, alguns casos foram associados a uma patologia comum nos quelônios a lipidose hepática.



Figura 37 – Alterações macroscópicas de fígado em tartarugas exóticas – Lipidose hepática.

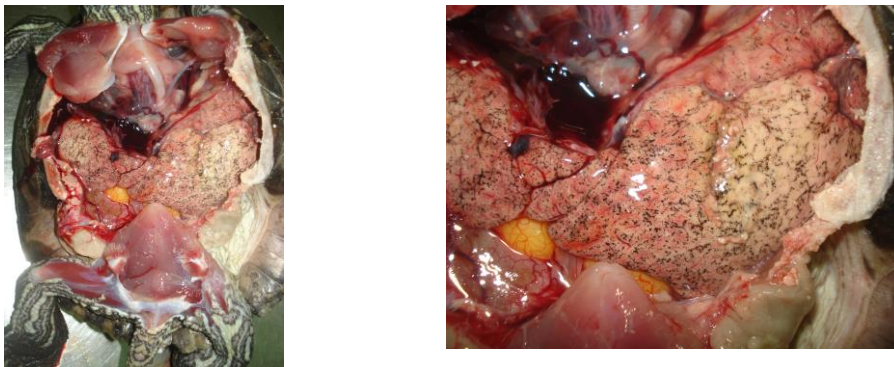


Figura 38 – Alterações macroscópicas de fígado em tartarugas exóticas.

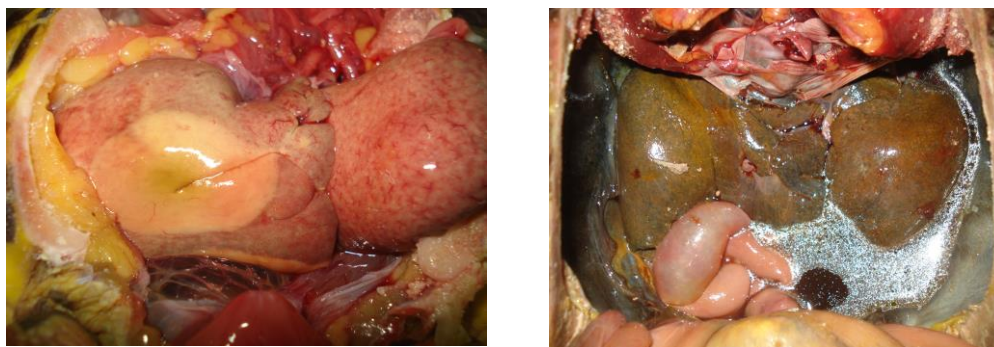


Figura 39 – Alterações macroscópicas de fígado em tartarugas exóticas. Lipidose hepática (imagem à esquerda). Parasitismo por Ascarididae (imagem à direita).

No entanto, surgiram dois casos onde o fígado apresentava uma coloração castanha-amarelada, representados na figura 39, sendo um dos casos devido à presença de parasitismo massivo por Ascarididae.

A maioria das amostras de fígado apresentou hepatócitos com depósitos de lípidos, variando o grau de acumulação de lípidos. Nos répteis este fenómeno, segundo a bibliografia, é considerado fisiológico, mas pode evoluir para um estado de doença designado por lipidose hepática. O exemplar representado na figura 40 considerou-se um caso de lipidose hepática, tendo-se observado hepatócitos com vacúolos citoplasmáticos de grandes dimensões e limites bem definidos que distorcem a célula conferindo-lhe morfologia mais arredondada. O núcleo, nestes casos, encontrava-se frequentemente deformado com a forma de meia-lua, empurrado para a periferia da célula. Nestas amostras observou-se necrose hepatocitária e alguns depósitos de melanina.

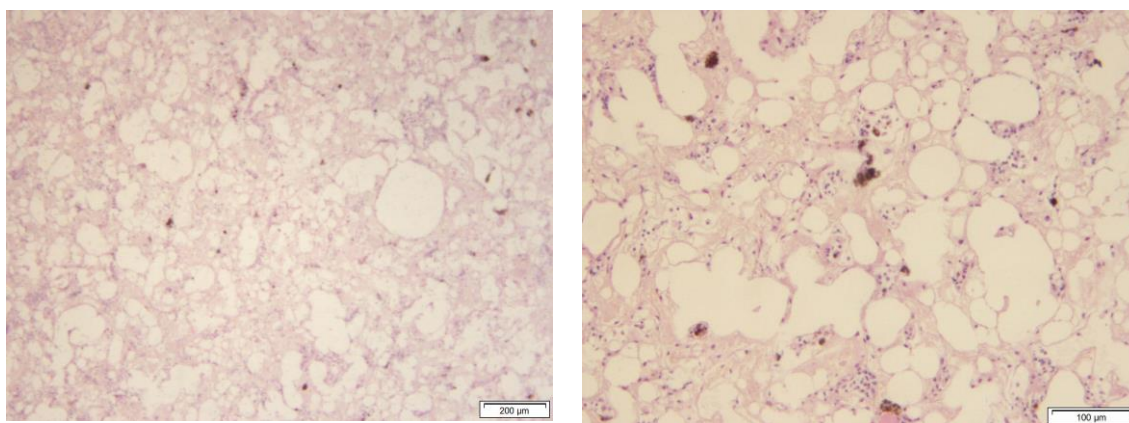


Figura 40 – Fígado. Lipidose hepática. Quelónio. H-E. 40x e 100x

A lipidose hepática é frequente nos quelónios em cativeiro (Frye 1991 c; Jackson 1991; Bone 1992; Divers and Cooper 2000; McArthur 2008 j) e caracterizada

por acumulação excessiva de triglicéridos no interior dos hepatócitos (Hernandez-Divers and Cooper 2006).

Os mamíferos e as aves armazenam a gordura subcutaneamente o que ajuda no isolamento térmico, enquanto nos répteis este processo não se aplica por ser uma espécie ectotérmica. Neste sentido, a maioria dos répteis armazena a gordura em locais específicos, tais como órgãos localizados no interior da cavidade celómica (zona caudoventral). O fígado é o principal órgão de armazenamento de gordura nos quelónios. O armazenamento de gordura tem como função o fornecimento de energia durante o período de hibernação/estivação e de jejum, assim como proporcionar lípidos (lipogénese) durante a vitelogénese (Gatten 1985). As funções do fígado podem variar de forma drástica à medida que o animal se desenvolve, desde o ovo, passando pela fase juvenil, até à fase adulta, atingindo a maturidade sexual, assim como, podem ser afetadas por fenómenos sazonais, principalmente na época de hibernação e de estivação. Do ponto de vista do tamanho e do peso o fígado pode variar de acordo com a época do ano, o estado nutricional e o ciclo reprodutivo do animal (Hernandez-Divers and Cooper 2006).

O armazenamento de lípidos hepáticos, pode no entanto, tornar-se uma patologia. A lipídose hepática considerada um distúrbio metabólico, normalmente caracteriza-se por ser uma doença crónica e multifatorial (McArthur 2008 j).

A lipídose hepática raramente existe como única patologia, encontra-se sempre associada a um número variável de doenças crónicas que predis põem a uma deposição lipídica hepática inapropriada. Os fatores relativos que influenciam o desenvolvimento desta patologia são o conteúdo dietético não adequado com fontes de energia excessivas, a dieta com défices nutritivos (crónico), a influência sobre o metabolismo lipídico devido à presença de toxinas bacterianas e fúngicas, a anorexia, os períodos de hibernação longos e inadequados, os níveis excessivos da hormona paratiroide (*parathyroide hormone* - PTH) como resultado de produção de vitamina D inadequada ou devido a uma dieta com défices de cálcio e por último, o fotoperíodo inadequado ou outro fator exógeno que estimula incorretamente o metabolismo e o armazenamento lipídico na pré-hibernação (McArthur 2008 j).

As patologias predisponentes são hiperestrogenismo crónico (estase folicular), a atividade tiroideia anormal e a diabetes *mellitus*.

A alimentação inapropriada tem sido associada a casos de obesidade e por sua vez à presença de lipidose hepática, segundo o autor Bone (1992) (Bone 1992). O mesmo sugere que a alimentação excessiva (sobredosagem) deve ser evitada e que os alimentos, tais como a comida de gato, de cão, leite, geleia, pão, batatas fritas e queijo nunca devem ser dados como alimento, às espécies herbívoras. Os níveis excessivos de uma dieta rica em gordura (Bone 1992), com défices de proteína e alguns aminoácidos têm sido sugeridos na etiologia de lipidose hepática nos répteis (Frye 1991 c) e noutras classes (Johnson 1995). A incapacidade do fígado em metabolizar e processar as reservas de gordura mobilizadas durante o período de fome pode dever-se à ausência de alguns dos nutrientes essenciais que são fatores lipotrópicos (Frye 1991 c; Johnson 1995; Hoefer 1997).

Em Portugal, é comum a alimentação das tartarugas de cativeiro basear-se nos camarões que são ricos em gorduras. A maioria das tartarugas neste estudo tinha um historial de vida de cativeiro no passado, antes de serem abandonadas à sua sorte na natureza, e possivelmente terão sido alimentadas com camarões. Sugeriu-se a hipótese de estas tartarugas terem adquirido uma certa obesidade durante a vida de cativeiro antes de serem libertadas.

O hiperparatiroidismo crónico pode também resultar no desequilíbrio do metabolismo normal lipídico (Akmal, Kasim et al. 1990) e ser um fator predisponente nalguns casos de lipidose hepática. Neste caso ou num caso semelhante de endocrinopatias sensíveis à luz, podem fazer parte dos processos naturais que desencadeiam a deposição de gorduras na pré-hibernação (McArthur 2008 j).

Na vida selvagem as alterações metabólicas e de armazenamento de energia na pré-hibernação podem causar lipidose hepática benigna (Jackson 1980).

A lipidose hepática pode resultar de uma exposição de condições climatéricas inapropriadas durante o período de hibernação ou condições ambientais de cativeiro inadequadas, como por exemplo a ausência de fornecimento de luz e calor ou exposição a luz e temperaturas inadequadas no exterior. Em Portugal, no mercado de tartarugas exóticas como animais domésticos, a maioria das pessoas que adquirem as mesmas não cumpre as horas de luz solar e calor necessárias para o bem-estar da tartaruga, devido à falta de interesse pela informação correta.

A história clínica do animal pode variar, dependendo do tipo de causa ou de doença concomitante. Os sinais clínicos são normalmente típicos de um processo crónico de doença. Segundo Divers e Cooper (2000) estes sugerem que os quelónios apresentam apetite reduzido, atividade, fecundidade e fertilidade reduzida, perda de peso, complicações após a hibernação e alterações nas fezes (Divers and Cooper 2000). Neste trabalho não foram observados quaisquer sinais clínicos.

Quanto ao diagnóstico, com base nos parâmetros hematológicos, estes dependem da espécie, género, idade, período sazonal e ciclo reprodutivo. Podem identificar-se sinais de desidratação, no entanto, nos casos de hepatopatia crónica, a anemia pode estar presente e oculta os défices hídricos. Numa situação em que haja necrose do fígado normalmente traduz-se numa heterofilia e monocitose súbita. As alterações hematológicas são frequentes na doença crónica, mas possivelmente estão mais relacionadas com a presença de uma doença concomitante (Hernandez-Divers and Cooper 2006; McArthur 2008 j).

As alterações bioquímicas nos quelónios também não são específicas na lipidose hepática e podem igualmente estar associadas a uma doença concomitante. As enzimas utilizadas para a avaliação da função hepática não são válidas nos quelónios, porque também se encontram distribuídas noutros tecidos, incluindo músculo e rim. Na lipidose hepática ocorrem poucos danos hepatocelulares, logo, os níveis destas enzimas podem apresentar valores normais. Os ácidos biliares são considerados úteis na avaliação da função hepática nas aves e mamíferos, mas a sua aplicação nos répteis tem de ser ainda determinada de forma conclusiva (Skoczylas 1978). Apenas a avaliação dos ácidos biliares tem sido adaptada para as tartarugas terrestres (Montesinos, Martinez et al. 2002). Para o caso dos quelónios, ainda não está disponível uma avaliação para a biliverdina (pigmento principal dos mesmos) (McArthur 2008 j).

O diagnóstico pode ser feito a partir da radiografia, ecografia e endoscopia. A citologia do fluido celómico pode revelar células inflamatórias.

Na ecografia, o fígado normalmente é moderadamente ecodenso, no entanto com lipidose hepática, é considerado hiperecogénico (Center, Crawford et al. 1993; Redrobe 1997; Divers and Cooper 2000). Atualmente, não existe um critério que avalie o tamanho e a forma do fígado. A ecografia também permite a aquisição de biópsias ecoguiadas.

A endoscopia, a partir da celiotomia pré-femoral, permite a inspeção visual da estrutura e coloração do fígado. No caso de lipidose, observa-se uma coloração amarela ou pálida e uma textura friável. A partir da endoscopia rígida é possível realizar biópsias, embora as amostras sejam pequenas (McArthur 2008 j).

A histopatologia do tecido hepático obtido na biópsia ou no exame *post mortem* é o melhor método de avaliação de patologia hepática. A amostra deve ser tratada apropriadamente para cultura microbiológica, para histopatologia ou virologia.

Durante o exame *post mortem*, num caso de suspeita de lipidose hepática é importante avaliar os outros órgãos que possam predispor a alterações do metabolismo dos lípidos, como por exemplo o pâncreas (McArthur 2008 j). Neste trabalho não se verificaram alterações nesses órgãos em virtude de não fazer parte do protocolo. A lipidose hepática é um fenómeno relativo, que deve ser interpretada segundo a época ou estação do ano, assim como em relação a uma possível doença primária e ser quantificada no que respeita ao grau de deposição de gordura considerado normal para a espécie, género e a estação do ano (McArthur 2008 j). Na necrópsia, num caso de lipidose hepática, o fígado pode apresentar uma coloração pálida acastanhada ou branca (Frye 1991 a), tal como se observa nas figuras 37, 38 e 39. Normalmente apresenta aumento de tamanho, bordos redondos, textura mole, pode pesar mais do que o normal e quando é cortado torna-se friável (Vegad 1995). Durante as necrópsias verificou-se esta descrição, apenas não se registou o peso do fígado.

Do ponto de vista histopatológico, Thompson (1995) definiu a lipidose hepática como “uma acumulação excessiva de lípidos no interior dos hepatócitos” (Carlton and McGavin 1995), no entanto Elkan chamou a atenção que a deposição de lípidos intrahepáticos pode ser normal (Elkan 1981). Segundo Schaffer (1998) que escreveu especificamente sobre o fígado dos répteis, constatou categoricamente “que pequenas gotas de gordura podem aparecer normalmente no citoplasma hepático” (Schaffner 1998). Portanto, a presença de gordura no fígado dos répteis não é indicativo de lipidose hepática. Durante a observação das amostras de fígado deu-se a importância esta linha de pensamento e considerou-se que a maioria dos casos em que se diagnosticou lipidose hepática fosse sugestiva, à exceção do caso representado na figura 40. A deteção de gordura no fígado dos répteis não é particularmente difícil de observar. Num corte histológico os depósitos de lípidos aparecem como buracos que são vacúolos que

possivelmente foram preenchidos por ácidos gordos. No entanto, é de referir que ocasionalmente os vacúolos podem conter água, glicogénio ou outro tipo de materiais (Frye 1991 a). Por vezes a partir da observação microscópica ótica permite a distinção destes tipos de materiais, no entanto outros testes devem ser feitos, tais como colorações ou microscopia eletrónica. Uma vez detetada a presença de ácidos gordos num corte histológico do fígado é necessária uma análise antes de definir o diagnóstico (definitivo ou sugestivo). Esta análise consiste numa avaliação da localização precisa, da posição e do tamanho dos vacúolos de ácidos gordos. A presença de disfunção hepatocelular ou degeneração e de alterações inflamatórias, devem ser também observadas. No caso de lipidose hepática, representado na figura 40, observou-se hepatócitos com vacúolos citoplasmáticos grandes que distorciam a célula conferindo-lhe morfologia mais arredondada. O núcleo, nestes casos, encontrava-se deformado com a forma de meia-lua, empurrado para a periferia da célula.

Para além da microscopia ótica, a microscopia eletrónica também é importante para compreender o metabolismo dos lípidos nos répteis (De Brito Gitirana 1988), embora esta não seja utilizada como diagnóstico de rotina. Mesmo na presença de excesso de gordura, o diagnóstico de lipidose hepática não pode ser normalmente confirmado sem a história clínica do animal, o exame clínico (incluindo os resultados laboratoriais), os detalhes sobre o paciente e a sua condição de vida, como por exemplo a espécie, a idade, o género, a fase reprodutiva, a hibernação, a estivação e a dieta (Hernandez-Divers and Cooper 2006). No caso das tartarugas de vida selvagem não foi possível obter estas informações.

Num estudo de Divers e Cooper (2000), encontram-se descritos sete critérios relacionados com a interpretação histopatológica do tecido hepático em relação à lipidose patológica. Os critérios baseiam-se na quantidade de gordura por área e por tipo de célula, de acordo com género, espécie, idade e estação do ano. No entanto, continua a ser difícil de estabelecer o diagnóstico desta patologia em virtude da base de dados ser escassa (Divers and Cooper 2000).

Intestino

Quanto às alterações macroscópicas de intestino, para além das descritas anteriormente, observou-se um caso de impactação intestinal e alguns casos com

acumulação de conteúdo cecal. Na impactação intestinal, figura 41, visualizou-se um aumento de largura de uma porção de intestino delgado, a sua parede tinha uma coloração acinzentada, indicando provavelmente necrose tecidual dessa área. Realizou-se uma incisão na sua parede no sentido longitudinal e verificou-se no seu interior um conteúdo vegetal duro. Neste exemplar, a tartaruga teve morte súbita, sem sinais clínicos prévios que sugerissem doença. Nos casos com conteúdo cecal, conforme ilustrado na figura 41, observou-se o aumento do tamanho do cólon e no seu interior visualizou-se material de coloração negra e algumas pedras.

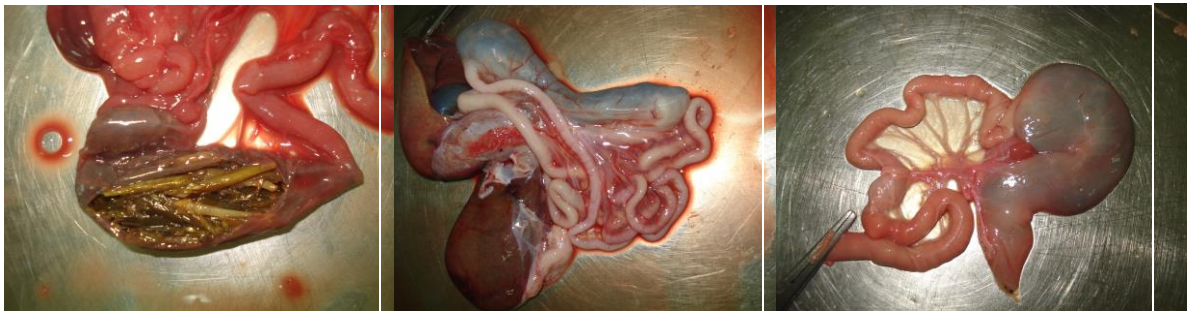


Figura 41 – Alterações macroscópicas de intestino. Impactação intestinal numa tartaruga hieroglífica (*Pseudemys concinna*) (imagem à esquerda) e acumulação de conteúdo cecal em diferentes tartarugas exóticas (imagem do centro e à direita).

As impactações são mais frequentes nos quelônios de cativeiro do que de vida livre. No entanto, as tartarugas marinhas são muitas vezes encontradas debilitadas ou com caquexia devido a uma obstrução gastrointestinal por causa da ingestão de sacos plásticos. Nestes casos muitas aparecem mortas com impactações no cólon transverso e distal. As tartarugas de água doce apresentam muitas vezes esta patologia provocada pela ingestão de materiais de pesca. As tartarugas terrestres que apresentam picacismo, podem aparecer com obstrução devido à ingestão de gravilha ou outros tipos de materiais do substrato (areia). Os animais semiaquáticos (por exemplo, as tartarugas da Flórida (*Trachemys scripta*) parecem estar predispostos à ingestão de corpos estranhos não obstrutivos, quando se encontram alojados em substrato de gravilha. A coloração da areia e o uso de resinas parecem ser atrativas (McArthur 2008 k).

A obstrução sem corpos estranhos tem sido descrita e pode ser devida a neoplasia, intussusceção ou vólvulos (Hasbun, Samour et al. 1998). A presença de material ou corpo estranho no trato digestivo não é indício de uma patologia, por vezes pequenas quantidades de corpo estranho são encontrados acidentalmente a partir de uma

radiografia, principalmente no intestino grosso (sem existir sinais clínicos de doença). Com este facto, nos casos com conteúdo cecal, sugerindo impactação cecal pode ser normal que o ceco apresente algum material acumulado.

Os sinais clínicos não são específicos e podem incluir anorexia, apatia, tenesmo (levantam a porção caudal do plastrão, mantendo os membros posteriores estendidos), regurgitação de fluidos e alimentos, caquexia e debilidade generalizada. Nos casos crónicos os animais podem demonstrar sinais clínicos de desidratação avançada (olhos ressequidos) (McArthur 2008 k).

Relativamente ao diagnóstico, segundo a bibliografia, geralmente recorre-se às técnicas imagiológicas. Nos casos de impactação, as técnicas mais utilizadas são a radiografia simples ou com contraste, a ecografia, a ressonância magnética e a endoscopia. Na radiografia muitas vezes observa-se material radio-denso e gás no íleo (McArthur 2008 k).

Sistema reprodutor feminino

Ao longo das necrópsias observaram-se alguns casos relevantes de patologias do sistema reprodutor feminino. A maioria destas patologias pode estar associada à vida em cativeiro, sendo importante salientar que a maior parte destas tartarugas tem um historial no passado de uma vida em cativeiro e podem transportar patologias desde dessa época.

Conforme ilustrado na figura 42, a estase folicular representa um excessivo número de folículos desenvolvidos em cada ovário. A maioria dos casos apresentou um quadro crónico, ou seja, observou-se que os ovários apresentavam um grande número de folículos bem desenvolvidos com um tamanho excessivo juntamente com folículos atresícos degenerados (folículos mais escuros) e com folículos em desenvolvimento, muito imaturos e pequenos (folículos amarelo claro) (figura 42).

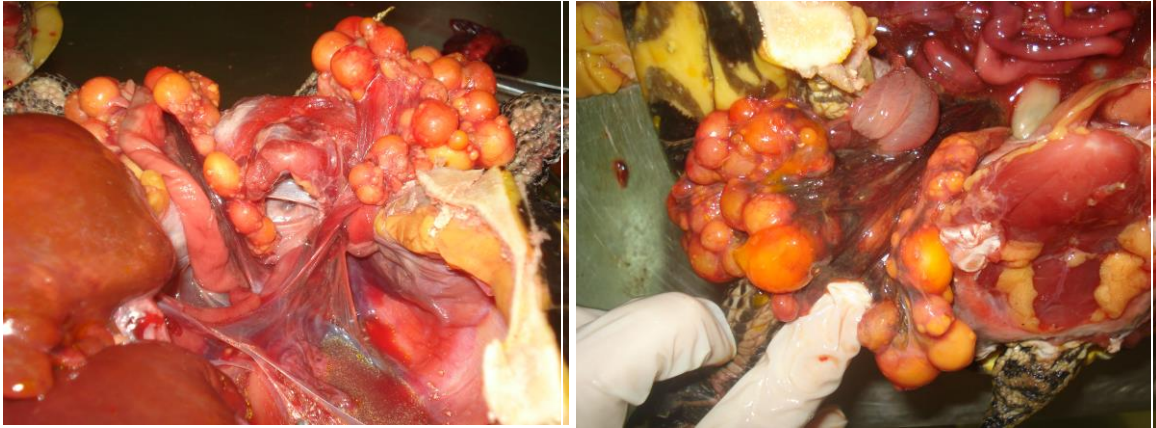


Figura 42 – Alterações macroscópicas do sistema reprodutor feminino de dois exemplares de tartarugas da Flórida (*Trachemys scripta*) – Estase folicular.

Quanto à etiologia da estase folicular coloca-se a hipótese de que seja a incapacidade de produzir progesterona a partir de um corpo lúteo funcional, de forma a inibir o crescimento folicular. Outros fatores que possivelmente possam influenciar esta patologia são: ausência de interações sociais, fatores ambientais, doença nutricional crónica e doença sistémica.

Do ponto vista social, segundo a literatura encontram-se registados casos de tartarugas de cativeiro (fêmeas com maturidade sexual) que desenvolveram esta patologia, como resultado da ausência de uma ovulação induzida devido a um longo período de isolamento (McArthur 2000). No entanto, são conhecidos casos de ovulações férteis que ocorrem passados alguns anos após um encontro bem-sucedido com um macho (McArthur 2008 I). Segundo Stuart (2008), existem relatos de casos de estase folicular cuja causa possivelmente tenha sido o contato recente de um macho, após um longo período de isolamento (McArthur 2008 I). É também plausível que o desenvolvimento folicular possa ser induzido por feromonas e outras interações comportamentais diretas entre os animais, incluindo a agressividade pré-copula (McArthur 2008 I).

Quanto às questões ambientais é possível que a hibernação, a temperatura e a luz solar sejam importantes para coordenação da espermatogénese no macho e da foliculogénese na fêmea. Os animais em cativeiro podem não se encontrar submetidos às alterações do ciclo anual do fotoperíodo e das temperaturas ambientais diárias, perdendo o seu ciclo de reprodução natural e falhando a ovulação. Os animais de vida selvagem dependem das alterações climáticas.

Do ponto vista de doença nutricional crónica e sistémica não existe uma base de dados sólida, sendo necessários mais estudos. A estase folicular pode ser uma condição secundária, quando as fêmeas são alojadas inapropriadamente ou adquirem qualquer doença crónica. A maioria das fêmeas com sinais indicativos de estase folicular encontra-se em más condições de alojamento e nutrição (McArthur 2008 l).

A estase folicular é uma doença crónica e os sinais clínicos podem surgir meses depois do acontecimento, consequentemente esta doença não tem apresentado sazonalidade exata ou consistente. Os sinais clínicos são subjetivos, parecem estar relacionados com a cronicidade e com o nível de desequilíbrio metabólico que o hiperestrogenismo produz (ex. supressão da medula óssea e lipidose hepática). Nos quelónios em cativeiro os sinais clínicos incluem a anorexia crónica, a paresia dos membros posteriores, a inatividade, o aumento de peso e a ausência de fezes (período superior a sete meses) (McArthur 2008 l). Neste trabalho os exemplares observados não apresentaram sinais clínicos relevantes.

O estabelecimento do diagnóstico nesta patologia é confirmado a partir da exploração da cavidade celómica e normalmente faz-se por exclusão. A definição do diagnóstico baseia-se na história clínica, na hematologia, nas análises bioquímicas e na ecografia. No entanto, pode-se recorrer à endoscopia celómica ou à exploração cirúrgica (celiotomia).

Quanto às análises hematológicas e bioquímicas pode-se observar leucopenia, hiperalbuminémia e hipercalcémia. No entanto, a hipercalcémia, a hiperalbuminémia e o aumento das proteínas totais ocorrem numa fêmea durante a vitelogénese. A diferença entre o período normal de desenvolvimento folicular e de estase folicular não é possível observar-se. Se a estase folicular não for complicada, outros parâmetros hematológicos e bioquímicos encontrar-se-ão normais. Os níveis de colesterol e de triglicéridos encontram-se elevados durante a vitelogénese, estes aumentos também ocorrem durante a lipidose hepática, a qual pode estar associada à estase folicular segundo o autor Stuart (McArthur 2008 l).

Neste estudo o estabelecimento do diagnóstico, nos casos desta patologia, foi feito *post mortem*, a partir das necrópsias.

Dentro do contexto de alterações macroscópicas do sistema reprodutor feminino, conforme explicitado na figura 43, observou-se um caso de celomite devido a uma

torção uterina. Neste caso, esta torção envolveu o colo uterino e a bexiga (◄). Na cavidade celômica verificou-se a presença de tecido fibroso, a congestão dos vasos sanguíneos das vísceras (sinais de septicémia) e a presença de uma casca de ovo (*) por baixo do lobo hepático direito próximo do estômago. O ovo encontrava-se seco e fixado ao tecido hepático. No interior dos corpos uterinos (Δ), tal como a figura indica, retiraram-se alguns ovos.

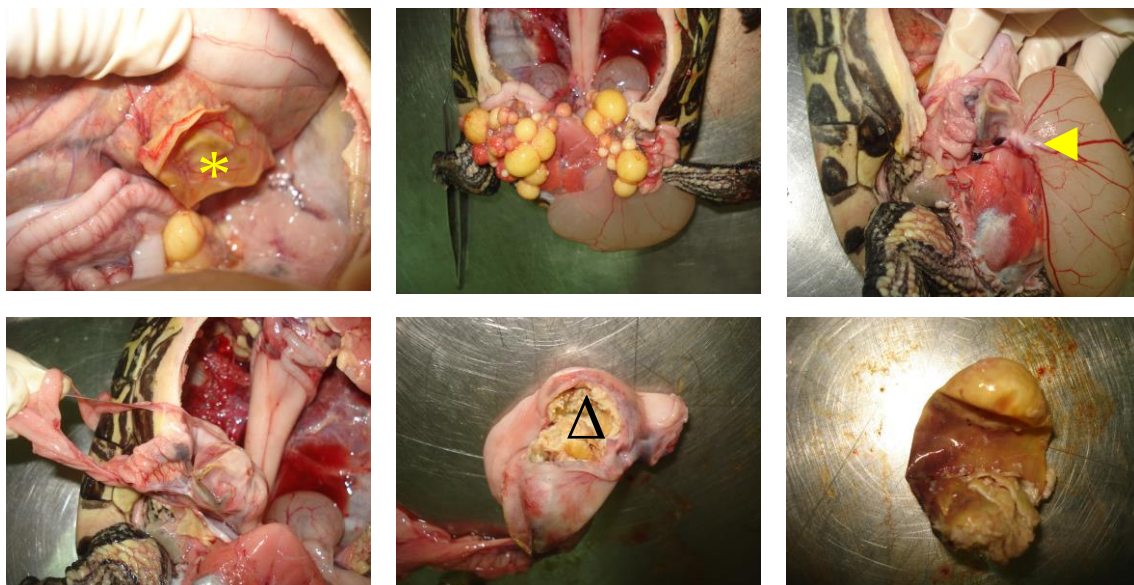


Figura 43 – Torção uterina e presença de um ovo na cavidade celômica numa tartaruga da Flórida (*Trachemys scripta*) – Celomite.

A celomite acontece quando existe uma rutura folicular e a gema, o albúmen e os tecidos embrionários vão para cavidade celômica, os mesmos são irritantes e induzem uma reação inflamatória aguda, resultando na presença de tecido seroso e fibrinoso. Do ponto vista histopatológico, a cavidade celômica pode apresentar muitos macrófagos e histiócitos nas camadas lipídicas, assim como numerosos heterófilos e linfócitos (Frye 1991 a). No líquido celômico pode-se observar a presença de gotículas de gema de vários tamanhos profundamente basófilos (Dorrestein 1997).

Os fatores que predispõem ao desenvolvimento de uma celomite são o trauma físico da cavidade celômica, a estase folicular, a lesão, degeneração, inflamação e infeção dos folículos pré-ovulatórios, assim como a aspiração por agulha fina do conteúdo celômico em quelônios fêmeas. Segundo o autor Frye (1991) existem casos que surgem num período de pós-ovulação devido ao trauma nos ovos (Frye 1991 a). A aspiração por agulha fina do conteúdo celômico deve ser realizada com cuidado,

especialmente no período pré-hibernação e imediatamente após a hibernação (onde a atividade folicular nos quelônios em cativeiro é forte (Innis et al, 2008 d).

Segundo Rosskopf e Woerpel (1982), numa doença pós parto nos quelônios a celomite deve ser sempre considerada como um dos diagnósticos diferenciais. Referem que estes casos são caracterizados pela heterofilia, aumento dos níveis AST, proteínas plasmáticas, LDH e a confirmação do diagnóstico é sugerida a partir da endoscopia celômica (Rosskopf, Woerpel et al. 1982).

No tratamento de um caso de estase folicular ou ovo retido, durante a ovariossalpingectomia ou salpingotomia a celomite pode ocorrer como complicação cirúrgica.

De acordo com o autor Frye (1991), a celomite pode ser diagnosticada a partir da história de tenesmo, pelo declínio da condição corporal e a partir das evidências observadas na radiografia (presença de ovos fraturados ou fragmentos do mesmo no interior da cavidade celômica) (Frye 1991 a).

Algumas fêmeas com anorexia sem causa aparente, revelaram no resultado da citologia do fluido celômico, o diagnóstico de celomite (Innis et al. 2008 d).

De forma semelhante, a laporoscopia pode também permitir a visualização do conteúdo celômico e de sinais da rutura folicular e de doença (Innis et al. 2008 d).

A partir da celiotomia, a remoção de material do ovo e a lavagem celômica são sugeridas para o tratamento de celomite. No entanto vários autores consideram que estes casos apresentam um prognóstico reservado (Rosskopf, Woerpel et al. 1982; Raiti 1995). A cultura e o TSA do conteúdo celômico são indicados se na análise citológica indicar a presença de possível infecção. A terapia antimicrobiana adequada pode ser administrada depois da realização destes testes.

Neste trabalho o diagnóstico foi estabelecido *post mortem*, a partir da realização da necrópsia e pressupôs-se que a causa da torção uterina possa ter sido devido a uma queda e/ou trauma.

7. CONCLUSÕES

Ao longo deste trabalho e durante toda a pesquisa bibliográfica tomou-se conhecimento da presença de poucos estudos relacionados com as patologias de tartarugas selvagens. Assim sendo, a partir das patologias descritas em tartarugas de

cativeiro procurou-se responder às questões sobre as alterações, do ponto vista macroscópico e microscópico, observadas durante as necrópsias.

A descrição das patologias foi direcionada nos possíveis fatores que se poderiam encontrar no meio selvagem e provavelmente os mais predisponentes ao desenvolvimento de determinada patologia. No entanto, como já foi descrito anteriormente deu-se maior relevância a alguns dos fatores de vida em cativeiro, pois estas tartarugas apresentavam um historial de cativeiro no passado. Concluiu-se que algumas patologias, como por exemplo a pneumonia, podem-se desenvolver no período de cativeiro e manterem-se nas tartarugas, quando estas são libertadas no meio selvagem.

Relativamente às alterações macroscópicas dos órgãos, o fígado (69%) foi o órgão que apresentou maior prevalência. Do ponto vista microscópico, o fígado (74%), o rim (74%) e a bexiga (67%) demonstraram maior percentagem de alterações.

Neste estudo, as patologias mais evidentes foram a lipidose hepática (74%), a septicémia (48%) e a SCUD (41%). Concluiu-se que no conjunto de patologias diagnosticadas, as mais preocupantes são as que envolvem a presença de bactérias no interior do organismo, principalmente nos casos de septicémia, SCUD, doença renal (especialmente a pielonefrite), pneumonia bacteriana e abscessos cutâneos/subcutâneos, assim como os casos de parasitismo e de pneumonia fúngica. Quando as tartarugas são indevidamente soltas na natureza tornam-se um foco de infeção, contribuindo para a disseminação de doenças infecciosas/parasitárias nas populações de quelónios autóctones.

Finalmente, concluiu-se que a maioria dos objetivos deste trabalho foi alcançada, no entanto há pontos em falta, não sendo a responsabilidade da estagiária. De acordo com algumas patologias identificadas, com o intuito de completar este estudo sanitário sobre estas espécies de tartarugas, seria necessário efetuar um registo de necrópsias a longo prazo, juntamente com a análise bacteriológica, virológica, parasitológica e histológica. Algumas patologias descritas sugerem a realização de um estudo hematológico, de forma a interpretar e diagnosticar com mais facilidade as mesmas.

BIBLIOGRAFIA

1. Johlin JM & Moreland FB (1933) Studies on the blood of the turtle after complete anoxia. *Journal of Biological Chemistry*, **103**: 107 - 114.
2. Duran-Reynals F & Clausen HJ (1937) A contagious tumor-like condition in the lizard (*Anolis equestris*) as induced by a new bacterial species *Serratia anolium*. *Journal Bacteriology*, **33**: 369.
3. Cowles RB & Bogert CM (1944) A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, (83): 265 - 296.
4. Moyle V (1949) Nitrogenous excretion in chelonian reptiles. *Biochemical Journal*, **44**: 581 - 584.
5. Rennick BR & Gandia H (1954) Pharmacology of smooth muscle valve in renal portal circulation of birds. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **85**: 234 - 236.
6. Ashley LM (1955) Laboratory Anatomy of the Turtle. W.M.C. Brown & Company, Dubuque, Iowa, pp. 48.
7. Khalil F & Haggag G (1955) Ureotelism and uricotelism in tortoises. *Journal of Experimental Zoology*, **130**: 423 - 432.
8. Lowe CH & Vance V (1955) Acclimation of the critical thermal maximum of the reptile *Urosaurus ornatus*. *Science*, (122): 73 - 74.
9. Kaplan HM (1957) Septicemic cutaneous ulcerative disease of turtles. *Proceedings of the Animal Care Panel*, **7**: 273.
10. Bishop JE (1959) A histological and histochemical study of the kidney tubule of the common garter snake, *Thamnophis sirtalis*, with special reference to the sexual segment in the snake. *Journal of Morphology*, **104**: 307 - 357.
11. Dantzler WH & Schmidt – Nielson B (1966) Excretion in the fresh-water turtle (*Pseudemys scripta*) and desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *American Journal of Physiology*: 198 - 210.
12. Jackson DC & Schmidt – Nielson K (1966) Heat production during diving in the fresh water turtle *Pseudemys scripta*. *Journal of Cell Physiology*, **67**: 225 – 232.

13. Elkan E & Zwart P (1967) The ocular disease of young terrapins caused by vitamin A deficiency. *Pathology Veterinary*, **4**: 201 - 222.
14. Gans C & Hughes GM (1967) The mechanism of lung ventilation in the tortoise (*Testudo graeca*). *Journal of Experimental Biology*, **47** (1): 1 - 20.
15. Schmidt - Nielsen B & Davies LE (1968) Fluid transport and tubular intercellular spaces in reptilian kidneys. *Science*, **159**: 1105 - 1108.
16. Bellairs A (1969) The life of reptiles. Body form, skeleton and locomotion, Vol.1, Weidenfeld and Nicolson, London, pp. 44 - 116.
17. Guibé J (1970) L'appareil digestif. In *Traité de Zoologie*, Vol. 14, ed. Cie, M. E., Librairies de L'Académie de Médecine, Paris, pp. 520 - 548.
18. Hoffstetter R & Gase JP (1970) Vertebrae and ribs of modern reptiles. In *Biology of the Reptilia, Morphology A*, Vol.1, ed. Gans, C., Academic Press, London, pp. 201-302.
19. Miller MR & Lagios MD (1970) The pancreas. In *Biology of the Reptilia*, Vol.3, ed. Gans, C. & Parsons, T. S., Academic Press, New York, pp. 319 - 346.
20. Jackson DC (1971) Mechanical basis for lung volume variability in the turtle *Pseudemys scripta elegans*. *American Journal of Physiology*, **220** (3): 754 - 758.
21. Schumacher IM (1973) The Head and Muscles and Hyolaryngeal Skeleton Of Turtles and Crocodiles. In *Biology of the Reptilia* ed. Gans, C. & Parsons, T. S., Academic Press, London, pp. 101 - 199.
22. Dantzler WH & Holmes WN (1974) Water and Mineral Metabolism in Reptilia. In *Chemical Zoology* ed. Florkin, M. & Scheer, B. T., Academic Press, London & New York, pp. 277 - 336.
23. Degenhardt WG & Christiansen JL (1974) Distribution and habitats of turtles in New Mexico. *Southwestern Naturalist*, (19): 21 - 46.
24. Wallach JD (1975) The pathogenesis and etiology of ulcerative shell disease in turtles. *Journal of Zoo Animal Medicine*, **6**: 11.
25. Zwart P & Truyens EHA (1975) Hexamitiasis in tortoises. *Veterinary Parasitology*, **1**: 175 - 183.
26. Dantzler WH (1976) Renal function (with special emphasis on nitrogen excretion). In *Biology of the Reptilia, Physiology A*, Vol.5, ed. Gans, C. & Dawson, W. R., Academic Press, London, pp. 447 - 503.

27. Derickson WK (1976) Lipid storage and utilisation in reptiles. *American Zoologist*, **16**: 711.
28. Ferguson HW (1976) The relationship between ellipsoids and melano-macrophage centers in the spleen of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Comparative Pathology*, **86**: 377 - 380.
29. Rossi J & Frye FL (1976) Two cases of turtle leprosy. *Annual Proceedings of American Association of Zoo Veterinarians*, **102**.
30. Wood SC & Lenfant CJ (1976) Respiration: mechanics, control and gas exchange. In *Biology of the Reptilia, Physiology A, Vol. 5*, ed. Gans, C. & Dawson, W. R., Academic Press, San Diego, pp. 225 - 274.
31. Luppá H (1977) Histology of the digestive tract. In *Biology of the Reptilia, Vol. 6*, ed. Gans, C. & Parsons, T. S., Academic Press, New York, pp. 225 - 313.
32. Parsons TS & Cameron JE (1977) Internal relief of the digestive tract. In *Biology of the Reptilia, Vol. 6*, Gans, C. & Parsons, T. S., Academic Press, London & New York, pp. 159 - 179.
33. Wallach JD (1977) Ulcerative shell disease in turtles: identificaton, prophylaxis and treatment. *International Zoo Yearbook* **17**: 170.
34. Fowler ME (1978) Metabolic bone disease. In *Zoo and Wild Animal Medicine*, ed. Fowler, M. E., W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 55 - 76.
35. Hitzig BM & Jackson DC (1978) Chemical control of ventilation in the unanaesthetised turtle. *American Journal of Physiology*, **235**: 257 - 264.
36. Keymer IF (1978 a) Diseases of Chelonia 1 (A necropsy survey of tortoises). *Veterinary Record*, **103**: 548 - 552.
37. Keymer IF (1978 b) Diseases of Chelonia 2 (A necropsy survey of turtles/terrapins). *Veterinary Record*, **103**: 577 - 582.
38. Skoczylas R (1978) Physiology of the digestive tract. In *Biology of the Reptilia, Physiology B, Vol. 8*, ed. Gans, C. & Gans, K. A., Academic Press, London & New York, pp. 589 - 717.
39. Fromtling RA & Kosanke SD (1979) Fatal *Beauveria bassiana* infection in a captive American alligator. *Journal of American Veterinary Medical Association*, **175** (9): 934.

40. Elkan E (1980) Reptilian fat bodies: A short review. *British Journal of Herpetology*, **6**: 75 - 77.
41. Fahey KM (1980) A taxonomic study of the cooter turtles *Pseudemys floridana* (Le Conte) and *Pseudemys concinna* (Le Conte), in the lower Red River, Atchafalaya River, and Mississippi River basins. *Tulane Studies in Zoology*, **22**: 49-66.
42. Fowler ME (1980) Comparison of respiratory infection and hypovitaminosis A in desert tortoises. In *Comparative Pathology of Zoo Animals*, ed. Montali, R. J. & Migaki, G., Smithsonian Institution Press, Washington, D. C., pp. 93.
43. Guard CL (1980) Comparative gut physiology and diets for reptiles. *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians*, Washington, D.C.
44. Jackson OF (1980) The sick chelonian. *Proceedings of the European Herpetological Symposium*, Costwold Wildlife Park, Oxford.
45. Slatopolsky E & Martin K (1980) Parathyroid hormone metabolism and its potential as uraemic toxin. *American Journal of Physiology*, **239**: F1 - F12.
46. Vogt RC (1980) Natural history of the map turtles *Graptemys pseudogeographica* and *G. ouachitensis* in Wisconsin. *Tulane Studies Zoology and Botany*, (22): 17 - 48.
47. Austwick PKC & Keymer IF (1981) Fungi and actinomyces. In *Diseases of the Reptilia*, Vol. 1. ed. Cooper, J. E. & Jackson, O. F., Academic Press, London, pp. 193 - 231.
48. Bellairs A & Kamal AM (1981) The chondrocranium and the development of the skull. In *Biology of the Reptilia*. ed. Gans, C. & Parsons, T. S., Academic Press, London, pp. 1 - 264.
49. Cooper J (1981) Bacteria. In *Diseases of Reptilia*. ed. Cooper, J. E. & Jackson, O. F., Academic Press, San Diego, pp. 165 - 192.
50. Cooper JE & Jackson OF (1981) Diseases of the Reptilia, Vol. 1 e Vol. 2. Academic Press, London, pp. 1 - 584.
51. Davies PMC (1981) Anatomy and physiology. In *Diseases of the Reptilia*. ed. Cooper, J. E. & Jackson, O. F., Academic Press, London, pp. 9 - 73.
52. Draper C & Walker R (1981) Patterns of oral bacterial infection in captive snakes. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **179**: 1223.

53. Elkan E (1981) Pathology and histopathological techniques. In *Diseases of the Reptilia*, ed. Cooper, J. E. & Jackson, O. F., Academic Press, London, pp. 75 - 91.

54. Frye FL (1981) Biomedical and Surgical Aspects of Captive Reptile Husbandry, 1st edn, Veterinary Medicine Publishing Company, Edwardsville, Kansas, pp. 296 - 307.

55. Marcus LC (1981) Veterinary biology and medicine of captive amphibians and reptiles, Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 1 - 239.

56. Minnich JE (1982) The use of water. In *Biology of the Reptilia*, Vol. 12. ed. Gans, C. & Pough, F. H., Academic Press, London, pp. 325 - 395.

57. Rosskopf WJ & Woerpel RW (1982) Paraphimosis in a Californian Desert Tortoise. *California Veterinarian*, (1): 29 - 30.

58. Brannian RE (1984) A soft tissue laparotomy technique in turtles. *Journal of American Veterinary Medical Association*, **185** (11): 1416.

59. Hoff GL & Hoff DM (1984) *Salmonella* and Arizona. In *Diseases of Amphibians and Reptiles*. ed. Hoff, G. L., Frye, F. L. & Jacobson, E. R, Plenum Book Company, New York, pp. 69 - 82.

60. Jacobson E (1984) Biology and diseases of reptiles: laboratory animal medicine, Academic Press, San Diego.

61. Mateo MR & Roberts ED (1984) Morphologic, cytochemical and functional studies of peripheral blood cells of young healthy American alligators (*Alligator mississippiensis*). *American Journal Veterinary Research*, **45**: 1046 - 1053.

62. Migaki G & Jacobson ER (1984) Fungal diseases of reptiles. In *Diseases of Amphibians and Reptiles*. ed. Hoff, G. L., Frye, F. L. & Jacobson, E. R., Plenum, New York, pp. 183 - 204.

63. Ross R (1984) The bacterial disease of reptiles. *The Institute for Herpetological Research*.

64. Cooper EL & Klumpau AE (1985) Reptilian Immunity. In *Biology of the Reptilia*, Vol. 14, ed. Gans, C., Academic Press, New York, pp. 599 - 678.

65. Gatten RE (1985) The uses of anaerobiosis by amphibians and reptiles. *American Zoologist*, **25**: 945 - 954.

66. Lanka V & Vit Z (1985) Reptiles et Amphibiens, Gründ, Paris.

67. Maderson PFA (1985) Some developmental problems of the reptile integument. In *Biology of the Reptilia*, Vol. 14, ed. Gans, C., Billet, F. & Maderson, P. F. A., John Wiley and Sons, New York, pp. 523 - 598.
68. Page CD (1985) Soft-tissue celiotomy in an Aldabra tortoise. *Journal Zoo Animal Medicine*, **16**: 113.
69. Evans HE (1986) Reptiles - Introduction and anatomy. In *Zoo and wild animal medicine*, ed. Fowler, M. E., W. B. Saunders, Philadelphia, pp.108 - 132.
70. Heard DJ & Cantor GH (1986) Hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* in an Aldabra tortoise. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **189**: 1143 - 1145.
71. Ishii K & Ishii K (1986) Glossopharyngeal innervation of chemo- and baroreceptors in the dorsal carotid artery of the tortoise *Testudo hermanni*. *Respiratory Physiology*, **65**: 295 - 302.
72. Barbadillo LJ (1987) La guía de Incafo de los Anfibios y Reptiles de la Peninsula Iberica, Islas Baleares y Canarias. INCAFO, Madrid, pp. 1 - 694.
73. Ferrer C (1987) The liver of *Testudo graeca*: A comparative study of hibernating and non hibernating animals. *Journal of Submicroscopic Cytology*, **19** (2): 275.
74. Plowman C & Montali R (1987) Septicemia and chronic abscesses in iguanas (*Cyclura cornuta* and *Iguana iguana*) associated with a *Neisseria* species. *Journal Zoo Animal Medicine*, **18**: 86 - 93.
75. Sichel G & Corsaro C (1987) Relationship between melanin contents and superoxide dismutase (SOD) in the liver of various species of animals. *Cell Biochemistry and Function*, **5**: 123 - 128.
76. De Brito Gitirana L (1988) The fine structure of the fat-storing cell (Ito cell) in the liver of some reptiles. *Zeitschrift für mikroskopisch - anatomische Forschung*, **102**: 143 - 149.
77. Jackson DR (1988) Reproductive strategies of sympatric freshwater emydid turtles in northern peninsular Florida. *Bulletin of the Florida State Museum. Biological Sciences*, **33**: 113 - 158.

- 78.** Montali RJ (1988) Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *Journal of Comparative Pathology*, **99**: 1 - 26.
- 79.** Scalia M & Geremia E (1988) The extracutaneous pigmentary system: evidence for the melanosynthesis in amphibia and reptilia liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **89B**: 715 - 717.
- 80.** Sypek J & Borysenko M (1988) Reptiles. In *Vertebrate Blood Cells*, ed. Rowley, A. F. & Ratcliffe, N. A., Cambridge University Press, Cambridge, U.K., pp. 211 - 256.
- 81.** Decreto-Lei nº 316/89. D. R. I Série. 219 (89-09-22) 4224-4227.
- 82.** Guraya SS (1989) Ovarian Follicles in Reptiles and Birds, Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 287.
- 83.** Stetson DL (1989) Turtle urinary bladder: regulation of ion transport by dynamic changes in plasma membrane area. *American Journal of Physiology*, **257**: 973 - 981.
- 84.** Akmal M & Kasim SE (1990) Excess parathyroid hormone adversely affects lipid metabolism in chronic renal failure. *Kidney International*, **37** (3): 854 - 858.
- 85.** Gibbons JW & Lovich JE (1990) Sexual dimorphism in turtles with emphasis on the slider turtle (*Trachemys scripta*). *Herpetology Monograph*, (4): 1 - 29.
- 86.** Hilf M & Wagner RA (1990) A prospective study of upper airway flora in healthy boid snakes and snakes with pneumonia. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **21** (3): 318.
- 87.** Lovich JE & Garsta WR (1990) The development and significance of melanism in the slider turtle. In *Life history and ecology of the slider turtle*, ed. Gibbons, J. W., Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., pp. 233-254.
- 88.** Mallaret MR & Turquand O (1990) Human salmonellosis and turtles in France. *Revue d'épidémiologie et de santé publique*, **38** (1): 71 - 75.
- 89.** Müller M & Sachsse W (1990) Herpesvirus-Epidemie bei der griechischen (*Testudo hermanni*) und der maurischen Landschildkröte (*Testudo graeca*) in der Schweiz. *Schweiz Archiv für Tierheilkunde*, **132** (1): 199 - 203.
- 90.** Parmenter RR & Avery HW (1990) The feeding ecology of the slider turtle. In *Life history and ecology of the slider turtle*, ed. Gibbons, J. W., Smithsonian Institution Press, Washington, D. C., pp. 257 - 266.

- 91.** Frye FL (1991 a) Biomedical and Surgical Aspects of Captive Reptile Husbandry, 2nd edn, Krieger Publishing Company, Melbourne, Florida, pp. 1 - 712.
- 92.** Frye FL (1991 b) Reptile care, an atlas of diseases and treatments, Vol.1, TFH Publications, Neptune City, New Jersey, pp. 1 - 650.
- 93.** Frye FL (1991 c) A Practical Guide for Feeding Captive Reptiles, Kreiger Publishing Company, Malabar, Florida, pp. 113 - 129.
- 94.** Jackson OF (1991) Chelonians. In *Manual of Exotic Pets*, ed. Beynon, P. H. & Cooper, J. E., British Small Animal Veterinary Association, Cheltenham, pp.221 - 243.
- 95.** Lebboroni M & Chelazzi G (1991) Activity patterns of *Emys orbicularis* L. (Chelonia Emydidae) in central Italy. *Ethology Ecology and Evolution*, **3** (3): 257-268.
- 96.** Mader DR (1991) Turtle and tortoise medicine and surgery. *Proceedings of the California Veterinary Medicine Association*.
- 97.** Alleman AR & Jacobson ER (1992) Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *American Journal Veterinary Research*, **53**: 1645 - 1651.
- 98.** Bone RD (1992) Gastrointestinal system. In *Manual of Reptiles*, ed. Beynon, P. H., Cooper, J. E. & Lawton, M. P. C., British Small Animal Veterinary Association, Cheltenham, pp. 101 - 116.
- 99.** Diretiva nº 43/92 (CEE). Jornal Oficial da U. E. L206 (92-05-21) 0001-0007.
- 100.** Jacobson ER (1992) Reptile dermatology. In *Kirk's current veterinary therapy XI, small animal practice*, ed. Kirk, R. W. & Bonagura, J. D., W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 1204 - 1210.
- 101.** Junge RE & Miller RE (1992) Reptile respiratory diseases. In *Current veterinary therapy XI*, ed. Kirk, R. W. & Bonagura, J. D., W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 210 - 213.
- 102.** Ryan TP (1992) Dermatophilosis in a Savannah monitor *Varanus exanthematicus*. *Bull Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, **22**: 7.
- 103.** Center SA & Crawford MA (1993) A retrospective study of 77 cats with severe hepatic lipidosis: 1975 - 1990. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1993 Nov. - Dec., **7** (6): 349 - 359.
- 104.** Mader DR & DeRemer K (1993) Salmonellosis in reptiles. *Vivarium*, **4**: 12.

105. Ernst CH & Lovich JE (1994) Turtles of the United States and Canada, Smithsonian Institution Press, Washington & London, pp. 1 - 578.

106. Fuselier L & Edds D (1994) Habitat partitioning among three sympatric species of map turtles, genus *Graptemys*. *Journal Herpetology*, (28): 154 - 158.

107. Holz PH & Barker IK (1994) The anatomy and perfusion of the renal portal system in the red-eared slider. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **28** (4): 378 - 385.

108. Jacobson ER (1994) Causes of mortality and disease in tortoises: a review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **25** (1).

109. Moll D (1994) The ecology of sea beach nesting in slider turtles (*Trachemys scripta venusta*) from Caribbean Costa Rica. *Chelonian Conservation and Biology* **1** (2): 107-116.

110. Carlton WW & McGavin MD (1995) Thomson's special veterinary pathology, Mosby, St Louis.

111. Endlich K & Massfelder T (1995) Vascular effects of parathyroid hormone in the split hydronephrotic rat kidney. *Journal of Physiology*, **483** (2): 481 - 490.

112. Feldman EC (1995) Disorders of the parathyroid glands. In *Textbook of Internal Veterinary Medicine*, ed. Ettinger, S. J. & Feldman, E. C., W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 1437 - 1466.

113. Johnson SE (1995) Diseases of the liver. In *Textbook of Internal Veterinary Medicine*, ed. Ettinger, S. J. & Feldman, E. C., W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 1350 - 1353.

114. Lagueux CJ & Bjorndal KA (1995) Food habits of *Pseudemys concinna suwanniensis* in a Florida spring. *Journal Herpetology*, (29): 122 - 126.

115. Nami R & Gennari C (1995) Calcitropic hormones and blood pressure in chronic renal failure. *Italian Journal of Mineral and Electrolyte Metabolism*, **9** (2): 113 - 118.

116. Raiti P (1995) Reproductive biology of reptiles. *Proceedings of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians October 27 - 29, 1995, C. A., Sacramento*, pp. 98 - 100.

117. Ramsay EC & Dotson TK (1995) Tissue and serum enzyme activities in the yellow rat snake (*Elaphe obsoleta quadrivittata*). *American Journal of Veterinary Research*, **56**: 423 - 428.

- 118.** Rosol TJ & Chew DJ (1995) Pathophysiology of calcium metabolism. *Veterinary Clinical Pathology*, **24** (2): 49 - 63.
- 119.** Tucker JK, Maher RJ & Theiling CH (1995) Melanism in the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) *Journal of Herpetology* (29): 291-296.
- 120.** Vegad JL (1995) Textbook of veterinary general pathology, Vikas, Jabalpur, India, pp. 35 - 36.
- 121.** Christiansen JL, Grzybowski JM & Kodama RM (1996) Melanomacrophage aggregations and their age relationships in the yellow mud turtle, *Kinosternon flavescens* (Kinosternidae). *Pigment Cell Research*, **9**: 185 - 190.
- 122.** Degenhardt WG, Painter CW & Price AH (1996) Amphibians & Reptiles of New Mexico, University of New Mexico Press, Albuquerque, pp. 1 - 431.
- 123.** Ernst CH, Altenburg RGM & Barbour RW (1996) Turtles of the world, <http://www.eti.uva.nl/turtles/>, acedido a 20/10/2011.
- 124.** Fleetwood JN & Munnell JF (1996) Morphology of the airways and lung parenchyma in hatchlings of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*. *Journal of Morphology*, (227): 289 - 304.
- 125.** Fritz U & Günther R (1996) Europäische Sumpfschildkröte - *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). In *Die Amphibien und Reptilien Deutschlands*, ed. Günther, R. & Fischer-Verlag, J., pp. 518 - 534.
- 126.** Garner MM, Homer BL, Raskin RE, Jacobson ER, Hall BJ, Weiss W & Berry KH (1996) Staining and morphologic features of bone marrow hematopoietic cells in desert tortoises (*Gopherus agassizii*). *American Journal Veterinary Research*, **57**: 1608 - 1615.
- 127.** Highfield AC (1996) Practical encyclopedia of keeping and breeding tortoises and freshwater turtles, Carapace Press, London, England.
- 128.** Johnson J. & Benson P. (1996) Laboratory reference values for a group of captive ball pythons (*Python regius*). *American Journal Veterinary Research*, **57**: 1304 - 1307.
- 129.** King G. (1996) Reptiles and herbivory. In *Turtles and Tortoises*, Chapman & Hall, London, pp. 47 - 60.

130. Meyer J (1996) Röntgenologische, Computer tomographische und Kernspintomographische Untersuchungen zum Verdauungstrakt der Griechischen Landschildkröte (*Testudo hermanni*). Dissertation, University of Vienna, pp. 196.

131. Murray MJ (1996) Pneumonia and respiratory function. In *Reptile Medicine and Surgery*, ed. Mader, D. R., W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 396 - 406.

132. Nagode L & Chew D (1996) Benefits of calcitrol therapy and serum phosphorus control in dogs and cats with chronic renal failure. *Veterinary Clinics of North America*, **26** (6): 1293 - 1330.

133. Pettan-Brewer KCB, Drew ML & Ramsay E (1996) Herpesvirus particles associated with oral and respiratory lesions in a California desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *Journal of Wildlife Diseases*, **32**: 521 - 526.

134. Rossi JV (1996) Dermatology. In *Reptile Medicine and Surgery*, ed. Mader, D. R., W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 104 - 117.

135. Segurado P (1996) Estudo da estrutura das populações e de alguns parâmetros demográficos de *Mauremys leprosa* e de *Emys orbicularis* em Portugal. *Actas do IV Congresso Luso-Espanhol, VII Congresso Espanhol de Herpetologia, Porto*.

136. Seidel ME & Dreslik MJ (1996) *Pseudemys concinna*. *Catalogue of American Amphibians and Reptiles*, (626): 1 - 12.

137. Westhouse RA & Jacobson ER (1996) Respiratory and pharyngoesophageal infection in a gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*). *Journal of Wildlife Diseases*, **32**: 682 - 686.

138. Araújo PR, Segurado P & Santos N (1997) Bases para a Conservação das tartarugas de água doce *Emys orbicularis* e *Mauremys leprosa*. *Instituto da Conservação da Natureza, Lisboa*, **24**.

139. Bjorndal KA, Bolten AB, Lagueux CJ & Jackson DR (1997) Dietary overlap in three sympatric congeneric freshwater turtles (*Pseudemys*) in Florida. *Chelonian Conservation and Biology*, **2**: 430 - 433.

140. Dorrestein GM (1997) Avian cytology. In *Avian Medicine and Surgery*, ed. Altman, R. B., Clubb, S. L., Dorrestein, G. M. & Quesenberry, K., W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 211 - 222.

141. Ernst CH & Barbour RW (1997) *Turtles of the world*, Smithsonian Institution Press, Washington, pp. 1 - 314.

142. Hoefler HL (1997) Diseases of the Gastrointestinal Tract. In *Avian Medicine and Surgery*, ed. Altmann, R. B., Clubb, S. L., Dorrestein, G. M. & Quesenberry, K., W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 419 - 453.

143. Holz P, Barker IK, Crawshaw GJ & Dobson H (1997) The anatomy and perfusion of the renal portal system in the red eared slider (*Trachemys scripta elegans*). *Journal Zoo and Wildlife Medicine*, **28**: 378 - 385.

144. Jacobson ER (1997) Diseases of the respiratory tract of chelonians. *Verhandlungsbericht des Internationalen Symposiums uber die Erkrankungen der Zootiere*, (38): 1 - 5.

145. Jacobson ER, Adams HP, Geisbert TW, Tucker SJ, Hall BJ & Homer BL (1997) Pulmonary lesions in experimental ophidian paramyxovirus pneumonia of Aruba Island rattlesnakes, *Crotalus unicolor*. *Veterinary Pathology*, **34**: 450 - 459.

146. Keller C (1997) Ecología de poblaciones de *Mauremys leprosa* y *Emys orbicularis* en el Parque Nacional de Doñana. Tese de doutoramento da Universidade Sevilha.

147. Kostka VM, Hoffmann L, Balks E, Eskens U & Wimershof N (1997) Review of the literature and investigations on the prevalence and consequences of yeasts in reptiles. *Veterinary Record*, **140**: 282 - 287.

148. Mader DR (1997) Reptilian urogenital system and renal disease. *Proceedings of the 21st Annual Waltham/OSU Symposium for the Treatment of Small Animal Diseases: Exotics*, Columbus, Ohio.

149. Packard MJ & Seymour RS (1997) Evolution of the amniote egg. In *Amniote Origins: Completing the Transition to Land*, ed. Sumida, S. S. & Martin, K. L. M., Academic Press, San Diego, C.A., pp. 265 - 290.

150. Redrobe S (1997) An introduction to chelonian radiography and ultrasonography. *British Chelonia Group Testudo*, **4** (4): 34 - 40.

151. Regulamento nº 2551/97 (CE). Jornal Oficial da U. E. L349 (97-12-19) 0004-0017.

152. Bennett RA (1998) Anaesthesia and analgesia. *Seminars in Avian and Exotic Medicine* (ed. Seahom, J. C.) **7** (1): 30 - 40.

- 153.** Berschauer R & Mader DR (1998) Hepatic abscess due to *Corynebacterium sp.* in desert tortoise, *Gopherus agassizii*. *Bull Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, **8**: 13 - 15.
- 154.** Crossley D, Altmiras J & Wang T (1998) Hypoxia elicits an increase in pulmonary vasculature resistance in anaesthetised turtles. *Journal of Experimental Biology*, **201** (24): 3367 - 3375.
- 155.** Farrel AP, Gamperl AK & Francis ETB (1998) Comparative aspects of heart morphology. In *Biology of the Reptilia, Vol.19 (Morphology)*, ed. Gans, C. & Gaunt, A. S., Society for the Study of Reptiles and Amphibians, Ithaca, New York, pp. 375 - 419.
- 156.** Hasbun C, Samour J & Al-Ghais S (1998) Duodenal volvulus in free-living green turtles from coastal United Arab Emirates. *Journal of Wildlife Diseases*, **34** (4).
- 157.** Jorgensen CB (1998) Role of the urinary and cloacal bladders in chelonian water economy: historical and comparative aspects. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **73** (4): 347 - 366.
- 158.** Perry SF (1998) Lungs: comparative anatomy, functional morphology and evolution. In *Biology of the Reptilia, Vol. 19*, ed. Gans, C. & Gaunt, A. S., Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Ithaca, New York, pp. 1 - 97.
- 159.** Schaffner F (1998) The liver. In *Biology of the Reptilia. Morphology G, Visceral Organs, Vol.19*, ed. Gans, C. & Gaunt, A. S., Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Ithaca, New York, pp. 485 - 531.
- 160.** Alleman AR, Jacobson ER & Raskin RE (1999) Morphologic, cytochemical staining and ultrastructural characteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*). *American Journal Veterinary Research*, **60**: 507 - 514.
- 161.** Decreto-Lei nº 140/99. D. R. I-A. Série. 96 (99-04-24) 2183-2212.
- 162.** Decreto-Lei nº 565/99. D. R. I-A. Série. 295 (99-12-21) 9100-9115.
- 163.** Diethelm G & Mader DR (1999) The effect of FIO₂ on post anesthetic recovery times in the green iguana. *Proceedings of the Association of Reptilian Amphibian Veterinarians*, Columbus, Ohio: 169 - 171.
- 164.** Holz PH (1999 a) The reptilian renal portal system: a review. *Association Reptilian Amphibian Veterinarians*, **9** (1): 4 - 9.

- 165.** Holz PH (1999 b) The reptilian portal system: Influence on therapy. In *Zoo and Wild Animal Medicine, Current Therapy, Vol.4*, ed Fowler, M. E. & Miller, E. R., pp. 249 - 252.
- 166.** Johnson JC, Schwiesow T, Ekwall AK & Christiansen, JL (1999) Reptilian melanomacrophages function under conditions of hypothermia: observations of phagocytic behavior. *Pigment Cell Research*, **12**: 376 - 382.
- 167.** Schumacher IM, Rostal DC, Yates RA, Brown DR, Jacobson ER & Klein PA (1999) Persistence of maternal antibodies against *Mycoplasma agassizii* in desert tortoise hatchlings. *American Journal Veterinary Research*, (60): 826 - 831.
- 168.** Divers SJ & Cooper JE (2000) Reptile Hepatic Lipidosis. *Seminars In Avian and Exotic Pet Medicine (July)*, **9**: 153 - 164.
- 169.** Divers SJ & Lawton MPC (2000) Two techniques for endoscopic evaluation of the chelonian lung. *Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*: 123 - 125.
- 170.** Huchzermeyer FW & Cooper JE (2000) Fibrinosis, not abscess, resulting from a localized inflammatory response to infection in reptiles and birds. *Veterinary Record*, **147**: 515 - 517.
- 171.** ICNF - Instituto da conservação da Natureza e das Florestas (2000) Plano Sectorial da Rede Natura 2000: fauna, anfíbios e répteis. <http://www.icnf.pt/portal/naturaclas/rn2000/p-set/psrn-anf-rept>, acedido a 20/10/2011.
- 172.** Isaza R, Garner M & Jacobson E (2000) Proliferative osteoarthritis and osteoarthrosis in 15 snakes. *Journal Zoo and Wildlife Medicine*, **31** (1): 20 - 27.
- 173.** Jacobson ER, Brown DR, Schumacher IM, McLaughlin GS, Brown MB & Klein PA (2000) An update on mycoplasmal respiratory disease of tortoises. *Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*: 131 - 132.
- 174.** Jacobson ER, Cheatwood JL & Maxwell LK (2000) Mycotic diseases of reptiles. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, **9** (2): 94 - 101.
- 175.** McArthur SDJ (2000) A review of 10 cases of follicular stasis in Testudo species. *Proceedings of the British Veterinary Zoological Society, Spring 2000*: 44 - 60.
- 176.** Origi FC & Jacobson ER (2000) Diseases of the respiratory tract of chelonians. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, **3** (2): 537 - 549.

- 177.** Segurado P (2000) Modelação da distribuição e da abundância local do cágado-mediterrânico (*Mauremys leprosa*) e do Cágado-de-carapaça-estriada (*Emys orbicularis*) em Portugal. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, pp. 1-115.
- 178.** Ferrand de Almeida N, Ferrand de Almeida P, Gonçalves H, Sequeira F, Teixeira J & Ferrand de Almeida F (2001) Guia Fapas Anfíbios e Répteis de Portugal. Câmara Municipal do Porto, Pelouro do Ambiente, Porto, Portugal, pp. 1-250.
- 179.** Harr KE, Alleman AR, Dennis PM, Maxwell LK, Lock BA, Bennett RA & Jaconson ER (2001) Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells and hematologic and plasma biochemical reference ranges in green iguanas. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **218**: 915 - 921.
- 180.** McArthur SDJ (2001) Emerging viral-associated diseases of chelonians in the United Kingdom. *Proceedings of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, Orlando, Florida: 103 - 116.
- 181.** Pasmans F & De Herdt P (2001) Induction of the respiratory burst in turtle macrophages by *Salmonella muenchen*. *Development and Comparative Immunology*, **25**: 159 - 168.
- 182.** Crespo C & Ayres C (2002) Estudio preliminar sobre la presencia de formas parasitarias en las heces del galápagos europeo en Galicia. *Libro de resúmenes del VII congreso Luso-Español de Herpetología*, Évora: 109.
- 183.** Da Silva E (2002) *Mauremys leprosa* (Schweiger, 1812). Em Atlas y Libro Rojo de los Anfíbios y Reptiles de España, ed. Pleguezelos, J. M., Márquez, R. & Lizana, M., Dirección General de Conservación de la Naturaleza e Asociación Herpetologica Española, Madrid, pp. 143 – 146.
- 184.** Girling JE (2002) The reptilian oviduct: a review of structure and function and directions for future research. *Journal of Experimental Zoology*, **292**: 141 - 170.
- 185.** Jacobson ER, Origgi F, Heard D & Detrisac C (2002) Immunohistochemical staining of chlamydial antigen in emerald tree boas (*Corallus caninus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **14**: 487 - 494.
- 186.** Montesinos A, Martínez R & Jiménez A (2002) Plasma bile acids concentration in tortoises: reference values and histopathologic findings of importance

for interpretation. *Proceedings of the 27th WSAVA/FECAVA/AVEPA Congress, Vol II, 3 - 6 October*, Granada, Spain: 125 – 126.

187. Thomas HL, Willer CJ, Wosar MA, Spaulding KA & Lewbart GA (2002) Egg retention in the urinary bladder of a Florida Cooter turtle, *Pseudemys floridana floridana*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, **12** (1): 4 - 6.

188. Agius C & Roberts RJ (2003) Melanomacrophage centers and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, **26**: 499 - 509.

189. Azevedo A & Lunardi LO (2003) Cytochemical characterization of eosinophilic leukocytes circulating in the blood of the turtle (*Chrysemys dorsibignih*). *Acta Histochemica*, **105**: 99 - 105.

190. Regulamento nº 349/03 (CE). Jornal Oficial da U. E. L51 (03-02-25) 0003-0018.

191. Brown JD, Richard JM, Robertson J, Holladay S & Sleeman JM (2004) Pathology of aural abscesses in free-living eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Journal of Wildlife Diseases*, **40**: 704 - 712.

192. Gyimesi ZS & Howerth EW (2004) Severe melanomacrophage hyperplasia in a crocodile lizard, *Shinisaurus crocodilurus*: a review of melanomacrophages in ectotherms. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, **14**: 19 - 23.

193. Hidalgo-Vila J, Martínez-Silvestre A, Pérez-Santigosa N, Díaz-Paniagua C, Andreu AC, Ruiz X, De Frutos C & León L (2004) Primeros resultados del estado sanitario de poblaciones de galápagos autóctonos y exóticos en el SO de la Península Ibérica. *Libro de resúmenes del VIII congreso Luso-Español de Herpetología*, Málaga: 97 - 98.

194. Soldati G, Lu ZH, Vaughan L, Polkinghorne A, Zimmermann DR, Huder JB & Pospischil A (2004) Detection of mycobacteria and chlamydiae in granulomatous inflammation of reptiles: A retrospective study. *Veterinary Pathology*, **41**: 388 - 397.

195. Cabral MJ, Almeida J, Almeida PR, Dellinger T, Ferrand de Almeida N, Oliveira ME, Palmeirim JM, Queiroz AI, Rogado L & Santos-Reis M (2005) Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal, Instituto da Conservação da Natureza, Lisboa, pp. 1 – 660.

196. Decreto-Lei nº 49/05. D. R. I-A Série. 39 (05-02-24) 1670-1708.

- 197.** O'Malley B (2005) General anatomy and physiology of reptiles. In *Clinical Anatomy and Physiology of Exotic Species: Structure and Function of Mammals, Birds, Reptiles, and Amphibians*, ed. O'Malley, B., Elsevier Saunders: 17-40.
- 198.** Oliveira ME, Brito JC, Dellinger T, Ferrand de Almeida N, Loureiro A, Martins HR, Pargana J, Paulo OS, Rito P & Teixeira J (2005) *Emys orbicularis*, Cágado-de-carapaça-estriada. Em *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal*, ed. Cabral, M. J., Almeida, J., Almeida, P. R., Dellinger, T., Ferrand de Almeida, N., Oliveira, M. E., Palmeirim, J. M., Queiroz, A.I., Rogado, L. & Santos-Reis, M., Instituto da Conservação da Natureza, Lisboa, pp. 1 – 660.
- 199.** Boyer TH (2006) Differential diagnoses by symptoms: Turtles, Tortoises and Terrapins. In *Reptile Medicine and Surgery*, ed. Mader, D. R., Elsevier Saunders, pp. 696 - 704.
- 200.** Boyer TH & Boyer DM (2006) Biology and Husbandry: Turtles, Tortoises and Terrapins. In *Reptile Medicine and Surgery*, ed. Mader, D. R., Elsevier Saunders, pp. 78 - 99.
- 201.** Cooper JE (2006) Dermatology - Ulcerative Lesions. In *Reptile Medicine and Surgery*, ed. Mader, D. R., Elsevier Saunders, pp. 213.
- 202.** DeNARDO D (2006) Dystocias. In *Reptile Medicine and Surgery*, ed. Mader, D. R., Elsevier Saunders, pp. 791.
- 203.** Hernandez-Divers SJ & Cooper JE (2006) Hepatic Lipidosis. In *Reptile Medicine and Surgery*, ed. Mader, D. R., Elsevier Saunders, pp. 806 - 813.
- 204.** Holz P (2006) Renal Anatomy and Physiology. In *Reptile Medicine and Surgery*, ed. Mader, D. R., Elsevier Saunders, pp. 135 - 144.
- 205.** Murray MJ (2006) Pneumonia and Lower Respiratory Tract Disease. In *Reptile Medicine and Surgery*, ed. Mader, D. R., Elsevier Saunders, pp. 865 - 877.
- 206.** Rosenthal KL & Mader DR (2006) Microbiology: Fungal and Bacterial Diseases of Reptiles - Bacterial Diseases. In *Reptile Medicine and Surgery*, ed. Mader, D. R., Elsevier Saunders, pp. 227 - 238.
- 207.** Segade P, Crespo C, Ayres C, Cordero A, Arias MC, García-Estévez JM & Iglesias Blanco R (2006) *Eimeria* species from the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Reptilia: Testudines), in Galicia (NW Spain), with description of two new species. *Journal of Parasitology*, **92** (1): 69 - 72.

208. Fritz U & Havas P (2007) Checklist of Chelonians of the World. *Vertebrate Zoology*, **57** (2): 149 - 368.

209. Jacobson ER (2007) Overview of Reptile Biology, Anatomy, and Histology. In *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles - Color Atlas and Text*, ed. Jacobson, E. R., CRC Press Taylor and Francis Group, New York, pp. 1-2.

210. Stacy BA & Pessier AP (2007) Host response to infectious agents and identification of pathogens in tissue section. In *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles - Color Atlas and Text*, ed. Jacobson, E. R., CRC Press Taylor and Francis Group, New York, pp. 257 - 298.

211. Terrel SP & Stacy BA (2007) Reptile Necropsy Techniques. In *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles - Color Atlas and Text*, ed. Jacobson, E. R., CRC Press Taylor and Francis Group, New York, pp. 219 - 256.

212. Ayres C & Alvarez A (2008) On the presence of *Placobdella* sp. leeches on *Emys orbicularis*. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*, **8** (1): 53 - 55.

213. Innis C (2008) Chelonian Necropsy: Anatomy and common findings. *North American Veterinary Community Conference Exotics – Reptiles*, Boston: 1789 - 1790.

214. Innis C, Wilkinson R & McArthur S (2008 a) Problem-solving approach to common diseases of terrestrial and semi-aquatic chelonians - Septicaemia. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 366 - 367.

215. Innis C, Wilkinson R & McArthur S (2008 b) Problem-solving approach to common diseases of terrestrial and semi-aquatic chelonians - Lower respiratory tract infections. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 349 - 350.

216. Innis C, Wilkinson R & McArthur S (2008 c) Problem-solving approach to common diseases of terrestrial and semi-aquatic chelonians - Renal disease. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 361 - 365.

217. Innis C, Wilkinson R & McArthur S (2008 d) Problem-solving approach to common diseases of terrestrial and semi-aquatic chelonians - Yolk coelomitis. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 376 - 378.

218. McArthur S (2008 a) Anatomy and Physiology: Skin. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 36.

219. McArthur S (2008 b) Anatomy and Physiology. Body Cavities. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 37.

220. McArthur S (2008 c) Anatomy and Physiology: Respiratory system. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 38 - 40.

221. McArthur S (2008 d) Anatomy and Physiology. Urinary System. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 52 - 55.

222. McArthur S (2008 e) Anatomy and Physiology. Circulatory system. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 40 - 43.

223. McArthur S (2008 f) Anatomy and Physiology. Reproductive System. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 57.

224. McArthur S (2008 g) Anaesthesia, Analgesia and Euthanasia. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 398 - 400.

225. McArthur S (2008 h) Interpretation of presenting signs. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 279.

226. McArthur S (2008 i) Surgery – Specific surgical procedures: Subcutaneous abscess/fibriscesses. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 414 - 415.

227. McArthur S (2008 j) Problem-solving approach to common diseases of terrestrial and semi-aquatic chelonians - Hepatic lipidosis. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 333 - 335.

228. McArthur S (2008 k) Problem-solving approach to common diseases of terrestrial and semi-aquatic chelonians - Intestinal impaction/obstruction. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 340 - 343.

229. McArthur S (2008 l) Problem-solving approach to common diseases of terrestrial and semi-aquatic chelonians - Follicular stasis. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 325 - 329.

230. McArthur S & Meyer J (2008) Anatomy and Physiology. Gastrointestinal system. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 46 - 51.

231. McArthur S, Meyer J & Innis C (2008) Anatomy and Physiology: Shell and Skeleton. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, ed. McArthur, S., Wilkinson, R. & Meyer, J., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 35.

232. Stacy BA, Wellehan JFX, Foley AM, Coberley SS, Herbst LH, Manire CA, Garner MM, Brookins MD, Childress AL & Jacobson ER (2008) Two herpesviruses associated with disease in wild Atlantic loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Veterinary Microbiology*, **126** (1): 63 – 73.

233. Ward JP & Jackson DR (2008) *Pseudemys concinna* (Le Conte) – River cooter. In *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoises and Freshwater Turtle Specialist Group*, ed. Rhodin, A. G. J., Pritchard, P. C. H., van Dijk, P. P., Saumure, R. A., Buhlmann, K. A., Iverson, J. B., Chelonian Research Monographs N°. 5: 006.1 - 006.7. <http://www.iucn-tftsg.org>, acedido a 15/10/2012.

234. Hidalgo-Vila J, Díaz-Paniagua C, Ribas A, Florencio M, Pérez-Santigosa N. & Casanova JC (2009) Helminth communities of the exotic introduced turtle, *Trachemys scripta elegans* in southwestern Spain: Transmission from native turtles. *Research in Veterinary Science*, **86** (3): 463 - 465.

235. Thienpont S (2011-2015) Plan National d'Actions Cistude d'Europe. <http://www.developpement-durable.gouv.fr/Plan-national-d-actions-2011-2015,25159.html>, acedido a 1/07/2013.

236. Dijk PP, Iverson JB, Shaffer HB, Bour R & Rhodin AGJ (2012) Turtles of the world 2012 update: annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. In *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoises and Freshwater Turtle Specialist Group*, ed. Rhodin, A. G. J., Pritchard, P. C. H., van Dijk, P. P., Saumure, R. A., Buhlmann, K. A., Iverson, J. B., Mittermeier, R. A., Chelonian Research Monographs Nº. 5: 000.243 - 000.328. www.iucn-tftsg.org, acessado a 30/03/2013.

237. UCN (2012) IUCN Red List of Threatened Species, Versão 2012. <http://www.iucnredlist.org>, acessado a 1/07/2013.

238. Peris JC (2012) Estado sanitario de *Trachemys scripta elegans* y *Testudo hermanni hermanni* en la comunidad Valenciana. Tese de doutoramento, Facultad de Veterinaria - Departamento Produccion y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad CEU Cardenal Herrera, Valencia, pp. 200.