

ONTOGENIA DOS OSSOS DA CINTURA PEITORAL E MEMBROS TORÁCICOS EM EMBRIÕES DE *PODOCNEMIS UNIFILIS***FABIANO CAMPOS LIMA**

Laboratório de Anatomia Humana e Comparativa. Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí, Goiás, Brasil. E-mail: fabianocl21@hotmail.com Lima

ANDRÉ LUIZ QUAGLIATTO SANTOS

Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres. Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. E-mail: quagliatto.andre@gmail.com

RICARDO DE MATTOS SANTA RITA

Laboratório de Morfofisiologia. Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí, Goiás, Brasil. E-mail: ricosantarita@gmail.com

DAYANE KELLY SABEC-PEREIRA

Laboratório de Anatomia Humana e Comparativa. Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí, Goiás, Brasil. E-mail: daya_ks@hotmail.com

LUCÉLIA GONÇALVES VIEIRA

Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres. Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. E-mail: luceliabio@yahoo.com.br

LUIZ MARTINS DA SILVA JUNIOR

Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres. Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. E-mail: luizjunior.net@yahoo.com.br

TAIZ MALYSZ SARZENSKI

Laboratório de Anatomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: taismalysz@yahoo.com.br

ARTHUR PERILLO RODRIGUES

Laboratório de Anatomia Humana e Comparativa. Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí, Goiás, Brasil. E-mail: arthur_perillo@hotmail.com

PRISCILA ARAÚJO CABRAL

Laboratório de Anatomia Humana e Comparativa. Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí, Goiás, Brasil. E-mail: pri.calil@hotmail.com

KLEBER FERNANDO PEREIRA

Laboratório de Anatomia Humana e Comparativa. Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí, Goiás, Brasil. E-mail: kpereiraufg@gmail.com

Resumo: Os Testudines abrangem um grupo restrito que combinam aspectos primitivos e derivados, por exemplo, no esqueleto de seus membros. Para descrever a ontogenia do esqueleto da cintura peitoral e dos membros torácicos de *Podocnemis unifilis*, 66 embriões foram clareados. Já os ossos foram corados para a evidência da sequência de formação de seu esqueleto, que começa concomitantemente pelos ossos úmero, rádio e ulna, no estágio 20, estando todos os ossos da cintura peitoral com centros de ossificação corados no final deste estágio, mesmo período onde os metacarpos também se ossificam, primeiro pelos MCIV e MCIII, seguido para os ossos MCII>MCI>MCV. Entre os estágios 21 e 22, todas as falanges apresentam centros de ossificação marcados com Alizarina, primeiro as falanges médias e distais, e por último as proximais. Apenas no início do estágio 24 os carpos iniciam sua ossificação, primeiro com o osso intermédio do carpo, distal do carpo IV e central do carpo III, seguidos pelos demais até o estágio 25, onde o pisiforme é o último a apresentar seu centro de ossificação. A cronologia dos eventos ontogênicos nas diferentes espécies de répteis pode diferir substancialmente, mas o padrão em *P. unifilis* é similar ao dos demais Testudines.

Palavras-chave: Esqueleto, ossificação, répteis, tracajá.

BONE ONTOGENY OF THE PECTORAL GIRDLE AND THORACIC MEMBERS OF THE *PODOCNEMIS UNIFILIS* EMBRYOS

Abstract: The Testudines represent a small group that combines primitive and derived aspects, for example, in the skeleton of its members. To describe the ontogeny of the skeleton of the pectoral girdle and thoracic members of *Podocnemis unifilis*, 66 embryos were cleared. On the other side, the bones were stained to analyze the sequence of formation of their skeleton, which begins by the humerus, radius and ulna bones, by stage 20, all the bones of the pectoral girdle with colored centers of ossification at the end of this stage, in the same period when metacarpals also ossify, first by MCIV and MCIII, followed for bones MCII>MCI>MCV. Between stage 21 and 22, all phalanges have centers of ossification marked with alizarin; first the medial and distal phalanges, and finally the proximal phalanges. Only at the start of stage 24, the carpal ossification begins, first with the intermediate carpal bone, the distal carpal IV and central carpal III, followed by 25 others, where the pisiform is the last to make its center of ossification. The chronology of ontogenic events in different species of reptiles may differ substantially, but the pattern in *P. unifilis* is similar to the other Testudines.

Keywords: Skeleton, ossification, reptiles, yellow-spotted Amazon river turtle.

INTRODUÇÃO

Filogeneticamente, todas as alterações adaptativas seguem em direção linear, sendo orientadas e prolongadas por pressões seletivas, fazendo com que características vantajosas perpetuem (Hildebrant & Goslow, 2006). Assim, a morfologia e a fisiologia de um organismo se adaptam ao ambiente, sendo capazes de responder às suas modificações, que motivadas por forças evolutivas, podem culminar no desenvolvimento de um novo indivíduo (Hall & Miyake, 1992).

As características da evolução dos membros desempenharam um papel fundamental para a adaptação e radiação dos tetrapodas. A origem e distribuição destas evidências podem ser explicadas por meio de variáveis genéticas, que remetem a um ancestral comum. Portanto, a origem das alterações mais recentes, tais como dedos, são resultado de modificações genéticas em sistemas estabelecidos pela primeira vez nos vertebrados primitivos. Outrora, em alguns casos, mudanças dramáticas na morfologia podem ser resultado de mecanismos simples de desenvolvimento (Shubin et al., 1997).

Os Testudines abrangem um grupo restrito que ocupa uma diversidade de habitats. São animais que apresentam uma combinação de aspectos primitivos e derivados com características altamente especializadas (Pough et al., 2003), o que muito provavelmente representa a chave do seu sucesso evolutivo (Zardoya & Meyer, 2001).

Inúmeras mudanças ocorreram no esqueleto dos membros dos Testudines, principalmente em número, arranjo e proporções das falanges e dos ossos do carpo e tarso (Gaffney, 1984; Crumly & Sánchez-Villagra, 2004; Sheil, 2005). Tais alterações estão presentes nas espécies viventes, sendo algumas destas características oriundas de milhares de anos de evolução (Meylan, 1996; Sheil, 2003). Sua morfologia atual reflete o nicho de cada espécie (Pough et al., 2003), existindo uma grande variação dentro deste mesmo táxon. O delineamento dos processos ontogênicos inerentes a essas particularidades pode contribuir para explicar a geração de algumas características neste grupo.

Haja vista a existência de inúmeros fenótipos com discreta variação genotípica das mãos e pés, estas são estruturas convencionalmente de difícil estudo onto e filogenico, mas o conhecimento por menorizado dessas características é de conspícua importância para o entendimento da evolução dos Testudines (Shubin & Alberch, 1986, Sánchez-Villagra et al., 2007), tendo em vista que o desenvolvimento do esqueleto apendicular é uma importante fonte de informações filogenéticas e funcionais. Shubin & Alberch (1986) relataram a existência de uma sequência de processos ontogênicos que ocorrem nos membros dos Testudines. Condensações condrogênicas originam um eixo primário e um arco digital que conduzem o desenvolvimento dos elementos que formarão o esqueleto dos membros. Diversas investigações (Müller & Alberch, 1990; Sheil & Greenbaum, 2005; Sheil, 2003, Richardson et al., 1997; Sánchez-Villagra et al., 2008; Sheil & Portik, 2008) relatam uma sequência similar nas diversas espécies estudadas.

Estudos ontogênicos podem fornecer informações relevantes acerca de questões de homologia, bem como auxiliar na compreensão das relações de adaptação e crescimento, oferecendo perspectivas e previsões sobre o arranjo ósseo dos membros em diversas espécies (Richardson & Verbeek, 2003). Assim, com intuito de corroborar com informações que forneçam subsídios para o esclarecimento da evolução dos Testudines, objetivou-se descrever a ontogenia do esqueleto da cintura peitoral e membros torácicos de *Podocnemis unifilis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Ovos de *Podocnemis unifilis* foram adquiridos no período de desova de agosto de 2007, na área de reprodução natural do Encontro do Parque Nacional do Araguaia, Tocantins, Brasil, sob licença número 021/2007 IBAMA/RAN. A investigação foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisas Animais da Universidade Federal de Uberlândia, conforme expedido pelo protocolo CEUA-UFU 032/2009.

Um embrião foi coletado diariamente de um ninho escolhido aleatoriamente, até a eclosão, totalizando 66 amostras. Todos os embriões foram retirados dos ovos cortando-se a casca com tesoura cirúrgica, isolando-os do vitelo e dos seus envoltórios. Os estágios de desenvolvimento dos embriões foram nomeados de acordo com os critérios morfológicos externos. Para auxiliar a descrição dos processos de desenvolvimento, foi observado o esqueleto de dois espécimes adultos de *P. unifilis* que pertencem ao acervo particular do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres.

Cada espécime foi fixado em solução de formol 10%, diafanizado e as cartilagens e ossos corados com Alcian Blue e Alizarina red S, respectivamente (Dingerkus & Uhler, 1977; Davis & Gore, 1936). Para coloração das cartilagens, as etapas corresponderam na fixação por formaldeí-

do neutro (10%), lavagem em água destilada por 72 horas, coloração em solução de Alcian Blue por 48 horas, hidratação em séries crescentes de solução de etanol e transferência para solução saturada de Borato de sódio. Posteriormente foi realizada a coloração dos ossos através da diafanização por hidróxido de potássio (KOH 2%), coloração dos ossos por Alizarina red S e conservação do material em glicerina.

Os espécimes foram examinados em um microscópio estereoscópico acoplado a um sistema de captura de imagens e a presença ou ausência de cada um dos elementos ósseos, foi registrada para determinar a sequência ontogenética dos eventos de ossificação. Para a comparação do padrão de ossificação entre as espécies aqui apresentadas, apenas a sequência relativa foi importante, e por isso, as diferenças nas abordagens técnicas através dos estudos não foram empecilho na investigação.

RESULTADOS

A ossificação do esqueleto dos membros torácicos em *P. unifilis* começa concomitantemente e de forma discreta no início do estágio 20, onde os ossos úmero, rádio e ulna apresentam retenção de Alizarina, que de acordo com a intensidade da marcação, fornece, respectivamente, esta cronologia (Figura 1). Ao final deste estágio todos os ossos da cintura peitoral exibem suas diáfises coradas na seguinte sequência: escápula>processo acromial>coracóide.

Ainda no estágio 20, os metacarpos se apresentam em processo inicial de ossificação pela porção média da diáfise, primeiro pelos metacarpos (MC) IV e MCIII, seguido pelos ossos MCII>MCI>MCV (Figura 1, Tabela 1). O MCIV parece ser o primeiro a se ossificar devido à conspícua retenção de corante por este osso. No decorrer do processo de desenvolvimento, a ossificação dos metacarpos avança em direção às epífises, encontrando-se bem adiantados no momento da eclosão.

Durante o início do estágio 21, as primeiras falanges começam a se ossificar. Primeiro pelas falanges médias (FM)III e FMIV, e segue no decorrer do estágio com a FMII, FMV e falanges distais (FD)IV>FDIII>FDII>FDI>FDV, estando estas bem ossificadas no final do estágio. As falanges proximais (FP) iniciam sua ossificação no início do estágio 22, com a seguinte sequência: FPIII>PFIV>FPI>FPII>FPV (Figura 1).

Apenas no início do estágio 24, os carpos iniciam sua ossificação, primeiro com o osso intermédio do carpo, distal do carpo IV e central do carpo III, seguidos pelo ulnar do carpo, distal do carpo III, central do carpo II e distais do carpo II, V e I (Figura 1, Tabela 1). Somente no decorrer do estágio 25, o pisiforme surge com um inconspícuo centro de ossificação que se desenvolve, como nos demais ossos até o fim do período de incubação, estando todos os ossos em estado de ossificação bem avançado no estágio 26.

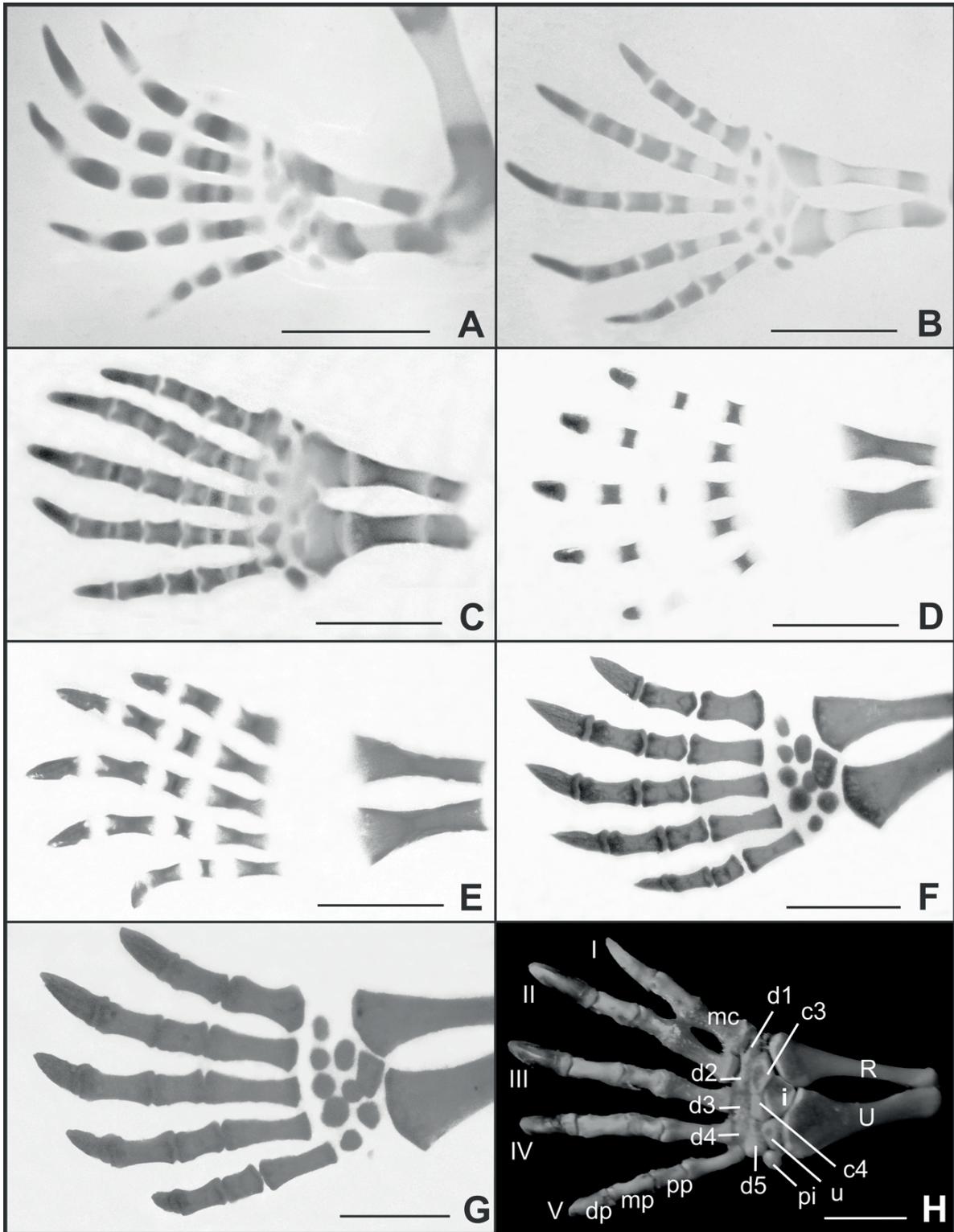


Figura 1. Fotografias da sequência de desenvolvimento da mão de *Podocnemis unifilis*. Estágio 19 (A); Estágio 20- (B); Estágio 20+ (C); Estágio 21 (D); Estágio 23 (E); Estágio 25 (F); Estágio 26 (G); esqueleto adulto da mão de *P. unifilis*. Abreviaturas: I – dedo I; II – dedo II; III – dedo III; IV – dedo IV; V – dedo V; R, rádio; U, ulna; c3, central 3; c4, central 4; i, intermédio; u, ulnar; d1, distal do carpo 1; d2, distal do carpo 2; d3, distal do carpo 3; d4, distal do carpo 4; d5, distal do carpo 5; mc, metacarpo; pp, falange proximal; mp, falange média; dp, falange distal. Barra: 2mm (H – 5mm).

Tabela 1. Eventos de ossificação dos elementos do membro torácico de Testudines da família Podocnemidae. pn, pós-natal; * dados indisponíveis; a- Dados desta investigação; b- Fabrezi et al., 2009; c- Vieira et al., 2011; d- Vieira & Santos 2007.

	<i>P. unifilis</i> ^a	<i>P. unifilis</i> ^b	<i>P. expansa</i> ^c	<i>P. expansa</i> ^d	<i>P. sextuberculata</i>
Úmero	21	14	*	*	12
Rádio	21	14	23	*	12
Ulna	21	14	23	*	12
Psiforme	25	16	40pn	*	16
Intermédio	24	14	23	*	15
Ulnar	24	14	24	*	15
Central 3	24	16	24	*	16
Central 4	24	16	24	*	16
DC1	24	15	24	*	16
DC2	24	15	24	*	16
DC3	24	14	24	*	16
DC4	24	14	24	*	15
DC5	24	15	25	*	16
MCI	22	16	23	18	16
MCII	21	15	23	18	16
MCIII	21	15	23	18	16
MCIV	22	15	23	18	16
MCV	22	15	23	18	16

Tabela 2. Eventos de ossificação dos elementos do membro torácico de Testudines. pn, pós-natal; * dados indisponíveis; S. ad, sub-adulto; a- Rieppel 1993a; b- Sheil & Greenbraum 2005.

	<i>C. serpentina</i> ^a	<i>C. serpentina</i> ^b	<i>P. sinensis</i>	<i>M. temminckii</i>	<i>P. hiliarii</i>	<i>A. spinifera</i>	<i>T. scripta</i>
Úmero	*	*	*	*	19	*	*
Rádio	22	21-	24	18	19	19+	20
Ulna	22	21-	24	18	19	19+	20
Psiforme	*	*	20pn	*	*	25	*
Intermédio	*	26	26-	*	26	24	*
Ulnar	*	*	26+	*	26	25	*
Central 3	*	*	27-	*	*	24	*
Central 4	*	*	*	*	S.ad	25	*
DC1	*	26-	25++	*	S.ad	23	*
DC2	*	26-	25++	*	S.ad	23	*
DC3	*	26	26-	*	S.ad	23	*
DC4	*	26	27-	*	S.ad	23	*
DC5	*	26	10pn	*	S.ad	25	*
MCI	*	23	26	24	23	21-	20
MCII	23	23-	25-	21	23	19+	20
MCIII	23	22	25+	21	23	19+	20
MCIV	23	22-	24-	21	23	19+	20
MCV	*	23+	25+	24	23	25	23

DISCUSSÃO

A tabela 1 compila a sequência de ossificação para alguns Podocnemidae e a Tabela 2 para outros grupos de Testudines.

Os membros, bem como as cinturas peitoral e pélvica dos vertebrados são diferenciados e atendem aos seus hábitos, devido a sinapomorfia dos grupos (Rieppel, 1993b). Neste contexto, os estudos que abordam os padrões de desenvolvimento desempenham um papel importante para o entendimento das variações na morfologia e ontogenia dos Testudines.

Rieppel (1993a) propõe que o desenvolvimento da plasticidade do esqueleto parece depender, de certa maneira, de sua compartimentalização, permitindo alterações localizadas no padrão da sequência de ossificação. Isto poderia perfeitamente explicar, por exemplo, variações na morfologia e ontogenia de porções do esqueleto de *P. unifilis* e outros Testudines, enquanto que outras permanecem invariáveis. Diferenças e similaridades são encontradas na morfologia, na cronologia e no padrão de ossificação em *C. serpentina* (Rieppel, 1993; Sheil & Greenbaun, 2005), *A. spinifera* (Sheil, 2003), *M. temminckii* (Sheil, 2005), *P. expansa* (Vieira & Santos, 2007) e *P. unifilis*. Em *M. temminckii* (Sheil, 2005).

No estágio 14, a cintura peitoral apresenta seu esboço cartilágneo formado, começando sua ossificação no estágio 20 pela porção média de cada escápula. Outrora sem a retenção de alizarina, que ocorre na transição dos estágios 20 e 21, período onde *P. unifilis* apresenta sua escápula corada, seguidos pelos processo acrômio e coracóide no fim do estágio. Em *C. serpentina* (Rieppel, 1993a), o primeiro elemento a se ossificar é também a escápula e, depois, o coracóide no estágio 22, que em *M. temminckii* (Sheil, 2005) e *P. unifilis* está bem ossificado no estágio 23. Em *A. spinifera* (Sheil, 2003), a ossificação da escápula e do coracóide começa pouco depois do úmero, rádio e ulna, sequência de ossificação idêntica de *C. serpentina* (Sheil & Greenbaun, 2005).

Em *M. temminckii*, a ossificação nos elementos do membro torácico é aparente nos estágios iniciais de desenvolvimento, assim como em *P. unifilis*. Nestas, o úmero se ossifica antes do rádio e da ulna. A ossificação do membro em *M. temminckii* (Sheil, 2005) começa no estágio 18 pelo úmero, rádio e ulna, contudo, a alizarina é menos evidente no rádio e na ulna. Já em *P. unifilis*, a intensidade de alizarina presente no rádio a partir do estágio 20 evidencia que este se ossifica mais rápido que a ulna. Rieppel (1993a) observou em *C. serpentina*, que os elementos esqueléticos do braço e antebraço se ossificam no estágio 20, começando pela diáfise do úmero, como também em *P. unifilis* e nos demais Testudines, e seguindo para o rádio e a ulna no estágio 22.

Segundo Hinchliffe (2002), o grau de mineralização do esqueleto, indicada pela densidade, não mostra uma tendência filogenética, mas in-

dica uma adaptação local para o ambiente em resposta as várias adaptações, o que explica a existência de limiares distintos de retenção de alizarina nas mesmas estruturas em espécies distintas de um mesmo grupo.

Os membros de diversos vertebrados, especialmente o dos Testudines, sofreram inúmeras variações no decorrer da evolução, principalmente no arranjo dos ossos do carpo e tarso (Sánchez-Villagra et al., 2008). Estas estruturas expressam inúmeras variações durante a evolução, Sugestão:excluir a frase acima e deixar apenas esta: Uma dessas variações seria a redução dos elementos do carpo e das falanges. Nos Pleurodiras, a anatomia do carpo é diversificada, existindo diferenças principalmente na fileira de distais do carpo (Rieppel, 1993a; Sánchez-Villagra et al., 2007, 2009). Tal característica dificulta conclusões precisas acerca das características ontogênicas nestes animais, principalmente daqueles caracteres que são também compartilhados com os demais tetrápodes (Crumly & Sánchez-Villagra, 2004; Shubin & Alberch, 1986). O esqueleto dos crocodilianos, por exemplo, possui a característica de redução drástica dos ossos do carpo em relação aos demais répteis. A teoria que explica tal peculiaridade é controversa, mas relata que, sobretudo os ossos do carpo e tarso involuíram para estruturas cartilágneas, ou se fundiram (Buscalioni et al., 1997; Müller & Alberch, 1990), o que aparentemente não ocorre com tanta ênfase nos Testudines, e em especial em *P. unifilis*, que mantém ainda um grande número de ossos no carpo.

Segundo Caldwell (1994), a ossificação do carpo começa quase sempre depois do tarso, o que pode ser averiguado em *P. expansa* (Vieira & Santos, 2007), *C. serpentina* (Rieppel, 1993a), *A. spinifera* (Sheil, 2003), *M. temminckii* (Sheil, 2005) e *P. unifilis*. No estágio 14, os primórdios cartilágneos da mão de *M. temminckii* estão bem definidos (Sheil, 2005), o que em *P. unifilis* ocorreu no fim do estágio 18.

Ao nascerem, todos os ossos do carpo em *P. unifilis* estavam com centros de ossificação marcados, como descrito em indivíduos adultos por Crumly & Sánchez-Villagra (2004). Os autores também afirmam que para os juvenis existem apenas três ossos na fileira distal do carpo, sendo fundidos os DCII e DCIII, DCIV e DCV, e ainda sem a presença do pisiforme, o que difere substancialmente do encontrado nesta investigação, onde os dez elementos ósseos do carpo estavam presentes.

Em *C. serpentina* (Rieppel, 1993; Sheil & Greenbaun, 2005), os DCI e DCIII são os primeiros a se ossificar, diferentemente do padrão das demais espécies relatadas (Burke & Alberch, 1985; Rieppel, 1993), onde o DCIV apresenta o primeiro centro de ossificação, assim como em *P. unifilis*, seguindo pelos ossos IC, e CCIII. Segundo Burke & Alberch (1986), numa sequência aleatória, o pisiforme é o último osso a se ossifi-

car nos Pleurodiras, como em *P. expansa* (Vieira & Santos, 2007) e *P. unifilis*, o que não ocorre em tartarugas marinhas, onde este nunca é o último a se ossificar entre os carpos. Em *Chelonia mydas* ao nascimento, o intermédio, o ulnar e o pisiforme estão todos bem ossificados, assim como os DCIV e DCV (Sánchez-Villagra et al., 2007).

O modelo mais adequado para explicar tais variações no carpo dos Testudines é atribuído pela comparação com as tartarugas marinhas. Segundo Gaffney & Meylan (1988), os Chelydridae são um grupo irmão das tartarugas marinhas. Com base no cladograma, *C. serpentina* pode ser usada para representar uma condição geral, uma vez que a ossificação de seu dedo III segue o padrão geral para os répteis diapsida. Nas tartarugas marinhas, como por exemplo, em *Eritmochelys imbricata*, a ossificação do MCV é acelerada e o pisiforme não é o último osso do carpo a se ossificar, mas sim o primeiro. Diferente do que ocorre com *C. serpentina* (Rieppel, 1993a), *A. mississippiensis* (Rieppel, 1993b) e *P. unifilis*, mais similar a *Dermochelys*, onde este ocupa uma posição estratégica em seu carpo modificado (Burke & Alberch, 1985), sendo a ausência ou presença do pisiforme uma característica intraespecífica entre os Chelydridae, e menos para os Pelomedusoides (Crumly & Sánchez-Villagra, 2004).

A presença de centros de ossificação do carpo em diversos répteis estudados, e em *P. unifilis*, é retardada em relação aos demais elementos do membro, mas os controles osteogênicos específicos que controlam tal característica são desconhecidos. No entanto, um fator que pode explicar o atraso da ossificação do carpo é seu padrão endocondral e não pericondral de formação como nos demais elementos (Caldwell, 1994).

Entre os diferentes Testudines, o padrão de ossificação das mãos difere de maneira inconspícua. *C. serpentina* (Rieppel, 1993a), *A. spinifera* (Sheil, 2003), *M. temminckii* (Sheil, 2005) e *P. expansa* (Vieira & Santos, 2007) apresentam cronologia similar para ossificação em MCI e MCV. Sheil (2003) aponta a sequência MCI, MCIII e MCIV para *A. spinifera*, sem apresentar maior retenção de corante em alguns destes elementos, o que ocorre com *P. expansa* (Vieira & Santos, 2007), apresentando maior retenção de alizarina em MCIII e em *P. unifilis* no MCIV, seguido pelos MCIII e MCII, o que segundo Rieppel (1993a), pode representar variações intraespecíficas nesses animais. Em *Chelonia mydas* (Sánchez-Villagra et al., 2007) e *A. spinifera* (Sheil, 2003), o MCIII é o primeiro elemento a se ossificar na mão, ao contrário de *C. serpentina* (Rieppel, 1993a), onde as falanges distais se ossificam antes dos metacarpos. Outrora, segundo Sheil & Greenbaum (2005), em *C. serpentina* os MCIII, MCIV e as falanges distais se ossificam concomitantemente, assim como em *M. temminckii* (Sheil, 2005). Em *P. sinensis*, Sánchez-Villagra et al. (2009) reportaram a ossificação destes elementos em um curto espaço de tempo, o que

segundo os autores pode ter dificultado a identificação da sequência ontogênica em *C. serpentina* (Rieppel, 1993a), *M. temminckii* (Sheil, 2005), e outros Testudines.

A fórmula falângica para os Pleurodiras é 2:3:3:3:3 (Sánchez-Villagra et al., 2001), como reportado para *P. expansa* (Vieira & Santos, 2007), *C. serpentina* (Rieppel, 1993; SHEIL, 2003), *M. temminckii* (Sheil, 2005) e *P. unifilis*, sendo uma característica plesiomórfica para os Testudines viventes, havendo variações como em *Pelomedusa subrufa*, 2:2:2:2:2 (Sánchez-Villagra et al., 2007), *A. spinifera*, 2:3:3:4:3 (Sheil, 2003), *Acantochelys*, que possui uma falange extra no dedo IV e *Emydura* (Sánchez-Villagra et al., 2007), que exhibe uma redução no número de falanges do dedo IV. A redução no número de falanges é uma característica para outro grupo de Testudines, os jabutis, que apresentam, em sua maioria, apenas duas falanges em cada dedo, como em *Geochelone elephantopus*, *G. gigantea*, *G. radiata*, *G. sulcata* e outros. Em adição a redução falângica, outras espécies apresentam redução na quantidade de dedos, como em *Homopus aerolatus*, *H. femoralis*, *Testudo horsfieldii* e *Kinixys belliana nogueyi* (Crumly & Sánchez-Villagra, 2004; Hitschfeld et al., 2008), todavia, ambos os fenômenos não são relatados em *P. unifilis*.

A direção de ossificação dos elementos das mãos é disto-proximal em *C. serpentina* (Sheil & Greenbaum, 2005). O padrão relatado para *C. serpentina* (Rieppel, 1993a), *M. temminckii* (Sheil, 2005) e *P. expansa* (Vieira & Santos, 2007) para a ossificação das falanges ocorre primeiro nas falanges distais dos dedos I e IV. Subsequentemente, as falanges médias dos dedos II e IV e a falange proximal do dedo I. Em *A. spinifera* a ossificação do dedo I e III progride em sentido próximo-distal, padrão que não pode ser traçado com segurança para *P. unifilis* devido às variações na sequência de ossificação das falanges. Contudo, nesta é conspícua a dominância durante a ossificação de um eixo que passa pelos dedos III e IV, evidenciado pela retenção de corante nos elementos esqueléticos desses dígitos.

Uma característica adquirida durante a evolução dos tetrápodos é a estabilidade proximal e a variabilidade distal nos membros (Hinchliffe, 1994), o que pode ser observada em *P. unifilis*, haja vista que a anatomia e os padrões ontogênicos dos ossos do carpo pouco diferem dentre os Pleurodiras, e em especial, entre os Podocnemididae. No entanto, a visível variação presente nas porções digitais apontam a multiplicidade de morfologias e padrões ontogênicos expressos pelos diversos Testudines.

A cronologia dos eventos ontogênicos nas diferentes espécies pode variar substancialmente, embora em algumas a sequência permaneça a mesma, o que pode estar provavelmente ligado às semelhanças desses animais. Mas tais variantes, como aquelas averiguadas em *C. serpentina*, podem ocorrer de forma distinta e aleatória para

uma característica sem afetar outra. Este é, provavelmente, o melhor exemplo que expressa as modificações no tempo de ossificação em relação às alterações adaptativas do esqueleto dos membros (Burke & Alberch, 1985).

Variações no processo de desenvolvimento são bem descritas na embriologia de diversos répteis, principalmente nos Testudines, devido às disparidades na embriogênese, que conduzem um desenvolvimento singular em cada animal. As mensurações podem ser imprecisas devido às variações abióticas durante o desenvolvimento como temperatura e umidade, influenciando no período de incubação e, conseqüentemente, na cronologia dos eventos de ossificação, mas não no padrão.

REFERÊNCIAS

- Burke, A.C & P. Alberch.** 1985. The development and homology of the chelonian carpus and tarsus. *J. Morphol* 186: 119-131.
- Buscalioni, A. D., F. Ortega, D. Rasskin-Gutman & B. P. Pérez-Moreno.** 1997. Loss of carpal elements in crocodylian limb evolution: morphogenetic model corroborated by palaeobiological data. *Biol J. Lin Soc.* 62: 133-144.
- Caldwell, M.W.** 1994. Developmental constraints and limb evolution in Permian and extant Lepidosauromorph diapsids. *J. Vert. Paleontol* 14: 459-571.
- Crumly, C.R. & M.R. Sánchez-Villagra.** 2004. Patterns of variation in the phalangeal formulae of Land Tortoises (Testudinidae): Developmental constraint, size, and phylogenetic history. *J. Exp. Zool (Mol Dev. Evol)* 302B: 134-146.
- Davis, D.D. & U.R. Gore.** 1936. Clearing and staining skeleton of small vertebrates. *Field Mus Nat. Hist.* 4: 3-15.
- Digenkus, G. & L. Uhler.** 1977. Differential staining of bone and cartilage in cleared and stained fish using alcian blue to stain cartilage and enzymes for clearing fish. *Stain Technol* 52: 229-232.
- Fabrezi, M., A. Manzano, V. Abdala & H. Zaher.** 2009. Developmental basis of limb homology in Pleurodiran turtles, and the identity of the hooked element in the chelonian tarsus. *Zool J. Lin Soc.* 155: 845-866.
- Gaffney, E.S. & P.A. Meylan.** 1988. A phylogeny of turtles. In M. J.BENTON MJ, (ed.). *The phylogeny and classification of the tetrapods. Amphibians, Reptiles, Birds.* Oxford, Clarendon.
- Gaffney, E.S.** 1984. Analysis of theories of chelonian relationship. *Syst Zool* 33: 283-301.
- Hall, B.K. & T. Miyake.** 1992. The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. *Anat. Embryol* 186: 107-124.
- Hildebrand, M. & G.E. Goslow.** 2006. *Análise da estrutura dos vertebrados.* 2nd ed., Atheneu, São Paulo.
- Hinchliffe, J.R.** 2002. Developmental basis of limb evolution. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 835-845.
- Hinchliffe, J.R.** 1994. Evolutionary developmental biology of the tetrapod limb. *Development* 163-168.
- Hitschfeld, E., M. Auer & U. Fritz.** 2008. Phalangeal formulae and ontogenetic variation of carpal morphology in *Testudo horsfieldii* and *T. hermanni*. *Amphibia Reptilia* 29: 93-99.
- Müller, G.B. & P. Alberch.** 1990. Ontogeny of the limb skeleton in Alligator mississippiensis: Developmental invariance and change in the evolution of Archosaur limbs. *J. Morphol* 203:151-164.
- Pough, F.H., C.M. Janis & J.B. Heiser.** 2003. *A vida dos vertebrados.* 3rd ed., Atheneu, São Paulo.
- Richardson, M.K., J. Hanken, M.L. Gooneratne, C. Pieau & A. Raynaud.** 1997. There is no highly conserved embryonic stage in the vertebrates: implications for current theories of evolution and development. *Anat. Hist. Embry* 196: 91-106.
- Richardson, M.K. & F.J. Verbeek.** 2003. New directions in comparative embryology and the nature of developmental characters. *Anim. Biol* 53: 303-311.
- Rieppel, O.** 1993a. Studies on skeleton formation in reptiles. 2. *Clerydra serpentina*. *Herpetologica* 49: 66-78.
- Rieppel, O.** 1993b. Studies of skeleton formation in reptiles. V. Patterns of ossification in the skeleton of *Alligator mississippiensis* DAU- DIAN (Reptilia, Crocodylia). *Zool J. Lin Soc.* 109:301-325.
- Sánchez-Villagra, M.R., C. Mitgutsch, H. Nagashina & S. Kuratani.** 2007. Autopodial development in sea turtles *Chelonia mydas* and *Careta careta*. *Zool Sci.* 24: 257-263.
- Sánchez-Villagra, M.R., H. Müller, C.A. Sheil, T. M. Scheyer, H. Nagashima & S. Kuratani.** 2009. Skeletal development in the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinen-*

sis (Testudines: Trionychidae). J. Morphol 236: 398-412.

- Sánchez-Villagra, M.R., J.M. Ziermann & L. Olsson.** 2008. Limb chondrogenesis in *Graptemys nigrinoda* (Emydidae), with comments on the primary axis and digital arch in turtles. Amphibia Reptilia 29: 85-92.
- Sheil, C.A. & E. Greenbaum.** 2005. Reconsideration of skeletal development of *Chelydra serpentina* (Reptilia: Testudinata: Chelydridae): evidence for intraspecific variation. J. Zool 265: 234-267.
- Sheil, C.A.** 2003. Osteology and Skeletal development of *Apalone spinifera* (Reptilia: Testudines: Trionychidae). J. Morphol 256: 42-78.
- Sheil, C.A.** 2005. Skeletal development of *Macrochelys temminckii* (Reptilia: Testudines: Chelydridae). J. Morphol 263:71-106.
- Sheil, C.A. & D. Portik.** 2008. Formation and ossification of limb elements in *Trachemys scripta* and discussion of autopodial elements in turtles. Zool Sci. 25: 622-641.

Shubin, N.H. & P. Alberch. 1986. A morphogenetic approach to the origin and basic organization of the tetrapod limb. In M. K. HECHT, B. WALLACE & G. T. PRANCE (eds.). Evolutionary Biology. New York, Plenum Press.

Shubin, N., C. Tabin & S. Carroll. 1997. Fossils, genes and the evolution of animal limbs. Nature 388: 639-648.

Vieira, L.G. & A.L.Q. Santos. 2007 Sequence of metacarpal and phalangeal bone formation in embryos of *Podocnemis expansa* Schweigger, 1812 (Testudines, Podocnemididae). Braz J. Morphol Sci. 24: 104-111.

Vieira, L.G., A.L.Q. Santos, F.C. Lima & L.R. Moura. 2011. Chondrogenesis of the Limbs and Mesopodial Ossification of *Podocnemis expansa* Schweigger, 1812 (Testudines: Podocnemididae). J. Morphol 272: 404-412.

Zardoya, R. & A. Meyer. 2001. On the origin of and phylogenetic relationships among living amphibians. Proc. Nat. Acad. Sci. 98: 7380-7383.