



Revista da

Biologia

Volume 16(1)

Julho 2016

ib.usp.br/revista

Evolução da carapaça das tartarugas

Ilustração científica

Ansiedade em camundongos

Predação em ninhos de maçaricos

Lontras do Rio Grande do Sul



Revista da Biologia

Publica textos de todas as áreas da Biologia, abordando questões gerais (ensaios, revisões e comentários) e específicas (artigos experimentais originais, descrição de técnicas e resumos expandidos).

Há espaço também para perspectivas pessoais sobre questões biológicas com relevância social e política (opinião).

A Revista da Biologia é gratuita e exclusivamente on-line. Sua reprodução é permitida para fins não comerciais.

ISSN1984-5154

www.ib.usp.br/revista

Contato

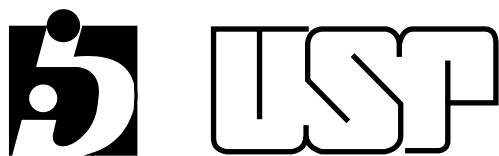
revistadabiologia@gmail.com

Revista da Biologia

Rua do Matão, trav. 14, 321
Cidade Universitária, São Paulo
São Paulo, SP Brasil
CEP 05508-090

Volume 16(1)

Publicado em Julho de 2016



Expediente do volume

Editor Executivo

Gilberto Xavier

Editores

Arthur S. C. França

Bryan Souza

Daniela Soltys

Débora Koshiyama

Eduardo Moretti

Rodrigo Pavão

Editores de Sessão

Claudio Struchiner

Daniel Lahr

Davidson Sodré

Déborah Santos

Fabício Baccaro

Fernando Gomes

Francisco Vasconcelos

José Guilherme Chauí-Berlink

Marcelo Pompêo

Renata Ferreira

Consultores científicos

Alfredo Porfírio

Amanda Maria Picelli

Bruno Martorelli Di Genova

Bruno Ramos

Camila Domit

Carlos Eduardo Tolussi

Carmen Eusebia Palacios Jara

Cinthia Indy Tamayose

Elisa Mari Akagi Jordão

Fernanda Helena Miranda Vasconcelos

Frederico Guilherme de Souza Beghelli

Gabriela de Lima Marin

Guilherme Ogawa

Michael Hrcir

Patrícia Rodrigues

Renato Honji

Roseberg Fernandes de Menezes

Thiago Paes de Barros De Luccia

Wellington Lobato Júnior

Ilustrações da capa: Vitória Sabino Rapatão

Manuscrito "Ilustração científica na Biologia: aplicação das técnicas de lápis de cor, nanquim (pontilhismo) e grafite"; Revista da Biologia (2016) 16(1):7-14

Volume 9(2)

Índice

- Abordagens convergentes, novidades evolutivas e a origem da carapaça das tartarugas** 1
Convergent approaches, evolutionary novelties and the origin of the turtle carapace
Gabriel de Souza Ferreira
- Ilustração científica na Biologia: aplicação das técnicas de lápis de cor, nanquim (pontilhismo) e grafite** 7
Scientific illustration in Biology: techniques of color pencil, china ink (pointillism) and graphite
Vitória Sabino Rapatão e Douglas Fernando Peiró
- Nado forçado crônico diminui a ansiedade em camundongos** 15
Chronic exposure to forced swimming decreases anxiety in mice
Arthur S. C. França, Fabíola P. S. Rufino, Bruno Lobão Soares e Sidarta Ribeiro
- Cães domésticos predadores de ninho de batuíra bicuda (*Charadrius wilsonia*) no nordeste brasileiro** 24
Domestic dogs as nest predators of Wilson's plover (*Charadrius wilsonia*) in northeastern Brazil
Cristovam Guerreiro Diniz, Nara Gyzely de Moraes Magalhães, Daniel Guerreiro Diniz, Patrick Douglas Corrêa Pereira, Dario Carvalho Paulo, Fabio Renato Rendeiro, David Francis Sherry e Cristovam Wanderley Picanço Diniz
- Levantamento bibliográfico sobre lontras (*Lontra longicaudis*) com ênfase às populações do Rio Grande do Sul, Brasil** 28
Bibliographical survey of otters (*Lontra longicaudis*) with emphasis on populations of Rio Grande do Sul, Brazil
Márcio Tavares Costa e Ana Paula Tavares Costa

Abordagens convergentes, novidades evolutivas e a origem da carapaça das tartarugas

Convergent approaches, evolutionary novelties and the origin of the turtle carapace

Gabriel de Souza Ferreira

Laboratório de Paleontologia de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Contato: gsferreirabio@gmail.com

Resumo. A origem da carapaça das tartarugas tem sido há muito tempo uma incógnita para a biologia evolutiva. Historicamente, duas principais hipóteses sobre seu surgimento foram propostas: a origem composta propunha sua gênese pelo sucessivo acúmulo de osteodermos e posterior fusão destes com as costelas e arcos neurais das vértebras truncais; a origem de novo, considerava a carapaça como uma estrutura nova, derivada de intensa modificação das costelas e arcos neurais. Nesta revisão, mostrarei como recentes avanços de abordagens em biologia evolutiva do desenvolvimento bem como novos achados paleontológicos favoreceram largamente a última hipótese, preenchendo lacunas sobre a origem e suportando a carapaça como uma novidade evolutiva, ilustrando como abordagens integradoras podem fornecer visões mais detalhadas do processo evolutivo.

Palavras-chave. Carapaça de tartarugas; Testudinata; Evo-Devo; Paleontologia

Recebido: 20mar16

Aceito: 30jun16

Publicado: 05jul16

Editado por Daniel

Lahr e revisado por

Alfredo Porfírio

Abstract. The origin of the turtle carapace has been for a long time an evolutionary mystery. Historically, two main hypotheses about its emergence disputed the interests of researchers: the composed origin proposed its genesis by the successive accumulation of osteoderms and their posterior fusion with the ribs and trunk vertebrae neural arches; the de novo origin, considered the carapace as a novel structure, derived from intense modification of the ribs and neural arches. In this review, I will show how recent advances on evolutionary developmental biology and new paleontological findings favored the latter hypothesis, filling the gaps about the origin and supporting the carapace as an evolutionary novelty, illustrating how integrative approaches can provide more detailed views on the evolutionary process.

Keywords. Turtle carapace; Testudinata; Evo-Devo; Paleontology

Introdução

A carapaça das tartarugas (Fig. 1a) é uma estrutura complexa que atrai o interesse dos biólogos há muito tempo. Hipóteses concorrentes sobre sua origem e das estruturas a ela relacionadas tem sido propostas e debatidas de forma intensa (Saint-Hilaire, 1809; Meckel, 1824; Cuvier, 1825; Vallén, 1924; Gilbert et al., 2001; Scheyer et al., 2008). Cuvier (1799) pensava que as placas neurais e costais (que compõem a carapaça dorsal juntamente com a nugal, periferias, pigais e suprapigal) teriam origem endoesquelética, i.e. que eram simplesmente compostas de arcos neurais e costelas expandidas, respectivamente (Fig. 2b). Posteriormente, Carus (1834) opôs-se a essa ideia ao sugerir que a carapaça teria se originado como uma estrutura composta pela fusão de arcos neurais e costelas com elementos exoesqueléticos sobrepostos, os chamados osteodermos (Fig. 2c).

Neste ensaio é apresentada uma revisão de estudos recentes que abordam a origem da carapaça das tartarugas do ponto de vista do desenvolvimento embrionário e

de novas descobertas de fósseis que contribuem para essa discussão e favorecem uma das hipóteses levantadas por estes autores. Esta revisão foca apenas no surgimento da carapaça (Fig. 1a), isto é, a parte dorsal do casco das tartarugas, uma vez que avanços similares em relação à parte ventral, o plastrão (Fig. 1b), ainda são necessários para uma melhor compreensão de sua origem.

Apenas costelas e arcos neurais modificados?

As placas neurais e costais são ossificações que surgiram-se umas às outras e constituem parte da carapaça das tartarugas (Fig. 1a). Considerando as hipóteses sobre a origem da carapaça, essas estruturas expandidas em formato de placa poderiam formar-se por dois processos distintos (Fig. 2): (i) pelo acréscimo de tecido ósseo ao redor dos arcos neurais e costelas (hipótese *de novo*; Fig. 2b) ou (ii) pela fusão destes ossos (elementos endoesqueléticos) com ossificações dérmicas (elementos exoesqueléticos) subjacentes (i.e. osteodermos) (hipótese *composta*; Fig. 2c).

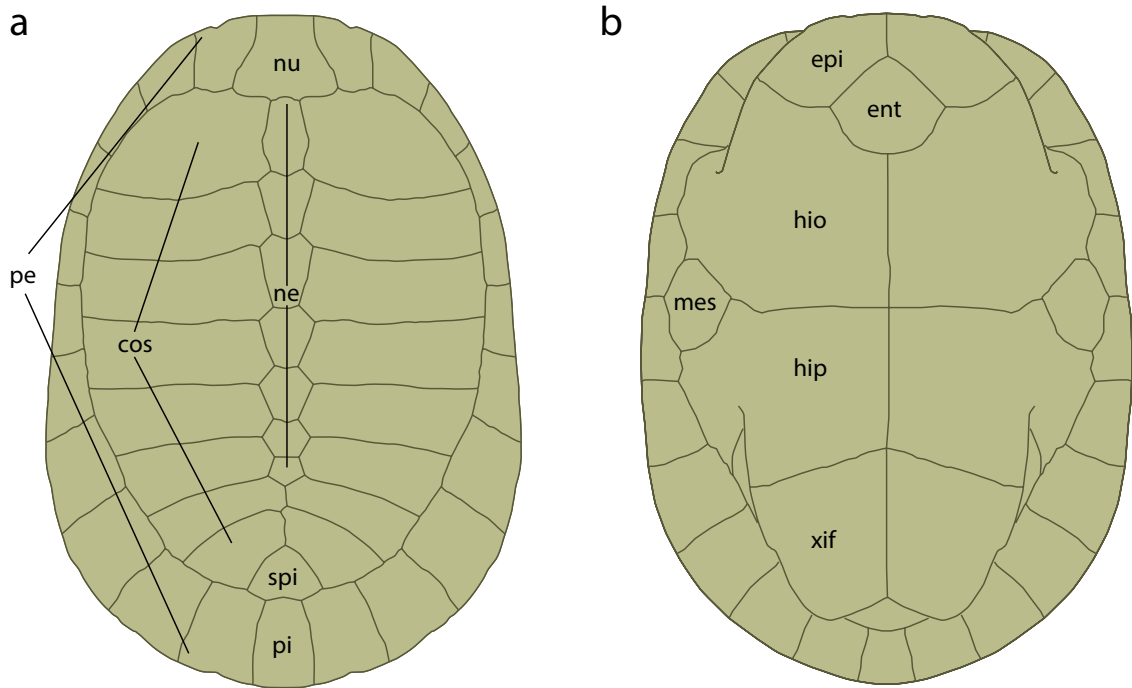


Figura 1. Casco completo de tartaruga (*Podocnemis expansa*). (a) Carapaça em vista dorsal e (b) plastrão em vista ventral. Abreviações: cos, placas costais; ent, entoplastrão; epi, epiplastrão; hio, hioplastrão; hip, hipoplastrão; mes, mesoplastrão; ne, placas neurais; nu, nuchal; pe, placas periferais; pi, pigal; spi, suprapigal; xif, xifoplastrão.

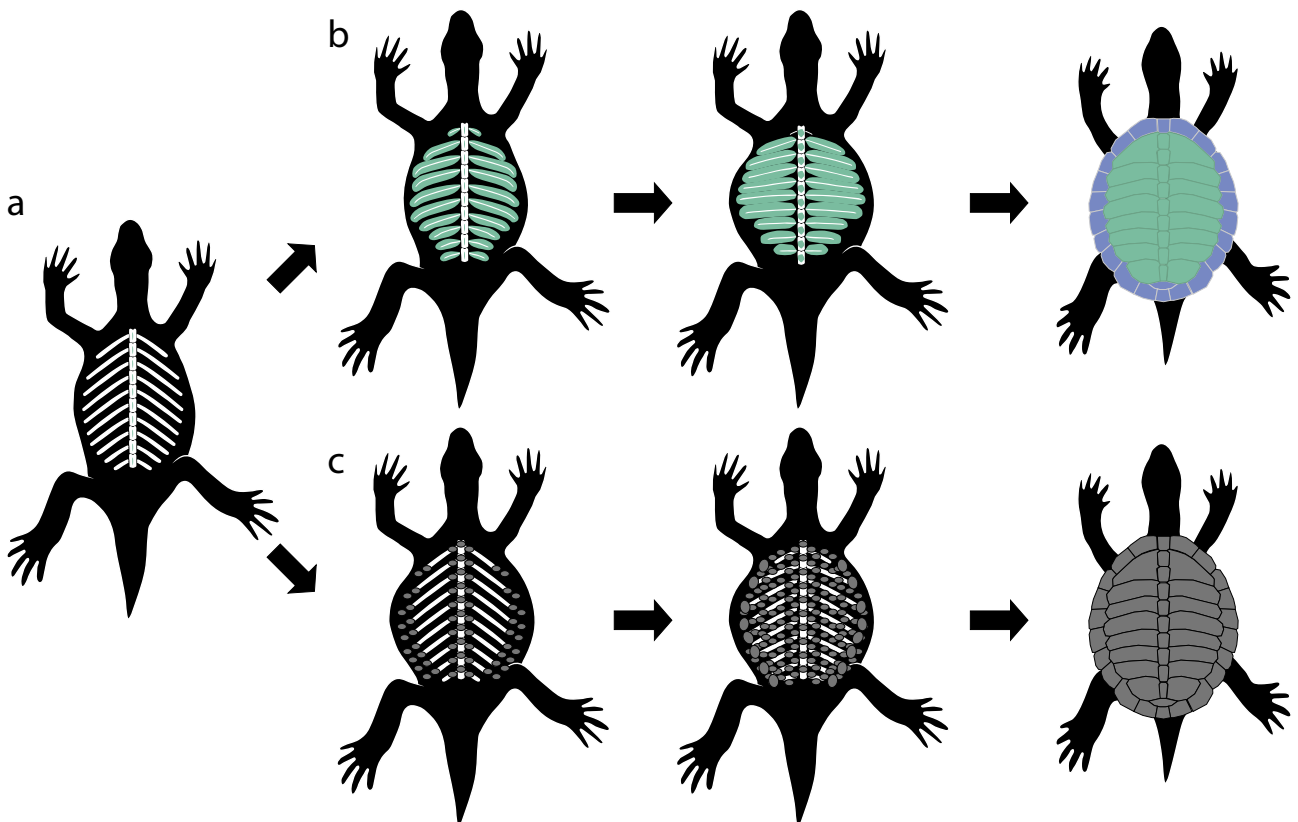


Figura 2. Hipóteses sobre o surgimento da carapaça das tartarugas. (a) ancestral amniota hipotético, (b) hipótese *de novo*, segundo a qual expansões crânio-caudais das costelas e arcos neurais das vértebras truncais se desenvolvem até coalescerem resultando nas placas costais e neurais, respectivamente; e (c) hipótese *composta*, segundo a qual osteodermos se acumulam no dorso dos táxons desta linhagem e posteriormente são fusionados às costelas e arcos neurais. Legenda: em branco, vértebras truncais e costelas, em verde, expansões das costelas e arcos neurais; em cinza, ossificações dérmicas (osteodermos), e em azul, ossificações de origem debatida.

Para avaliar quais destes modelos melhor explica o desenvolvimento da carapaça das tartarugas, Hirasawa e colaboradores (2013) estudaram o desenvolvimento embrionário da tartaruga-de-casco-mole-chinesa *Pelodiscus sinensis*. Os autores observaram que as placas originam-se somente a partir de elementos endoesqueléticos, abaixo da derme, pelo acréscimo de tecido ósseo ao redor do eixo da costela. Este acréscimo é encontrado também em outros amniotas (e.g. embriões de galinhas; Hirasawa et al., 2013), sendo a diferença entre estes dois casos apenas a magnitude do crescimento do tecido ósseo adjacente. No caso das tartarugas esse crescimento é grandemente expandido, preenchendo todo o espaço intercostal (i.e. entre as costelas). Neste contexto, as placas costais e neurais seriam simplesmente estados de caráter diferentes das costelas e arcos neurais, respectivamente (Hirasawa et al., 2013, 2015).

A Crista Carapacial

Embora o modo de desenvolvimento endoesquelético das costelas expandidas seja comum a tartarugas e outros amniotas, sugerindo uma diferença apenas de estados de um mesmo caráter, existe uma diferença fundamental quando se considera a caixa torácica das tartarugas: as costelas são curtas e projetadas lateralmente (Fig. 3) (Nagashima et al., 2015). O crescimento lateral das costelas é reconhecível no mesmo estágio embrionário que o aparecimento da crista carapacial (Burke, 1989; Hirasawa et al., 2015), estrutura específica das tartarugas. A crista carapacial (do original em inglês *carapacial ridge*) é o primeiro indício da carapaça durante a ontogenia (Nagashima et al., 2012) e desenvolve-se inicialmente na região lateral entre os membros, estendendo-se mais tarde cranial e caudalmente, resultando em um anel (Fig. 3b) que circunda o primórdio da carapaça (Hirasawa et al., 2015).

A crista carapacial delimita a borda mais lateral do domínio axial (Fig. 3a) derivado dos somitos, separando-o da parede lateral do corpo embrionário formada pela placa lateral (Burke, 1989; Nagashima et al., 2007). Esta estrutura não é encontrada em nenhum outro embrião amniota e pode ser considerada, portanto, uma novidade evolutiva (Wagner e Lynch, 2010) exclusiva às tartarugas. Os primórdios das costelas crescem lateralmente para dentro da crista carapacial, “sequestrados” no domínio axial do corpo embrionário e nunca adentram a parede lateral (Nagashima et al., 2012; Kuratani et al., 2011) como ocorre nos outros amniotas (Fig. 3a) (Burke, 1989). Este processo foi chamado de “sequestro axial” das costelas (*axial arrest* no original em inglês; Burke, 1989).

Durante o desenvolvimento do embrião dos demais amniotas, células derivadas dos somitos migram ventralmente de forma massiva para dentro da parede lateral (Burke, 1989) originando os primórdios distais das costelas (Fig. 3a). O sequestro axial dos primórdios das costelas nas tartarugas ocorre em todos os embriões de tartarugas, independentemente da morfologia do adulto (Hirasawa et al., 2015), e, desta forma, não pode ser considerado apenas um estado distinto de um caráter, como foi interpretado para as costelas expandidas, mas, na verdade, um caráter morfológico totalmente novo.

A crista carapacial parece ser a causa ou a estrutura morfológica que induz o crescimento horizontal das costelas (Burke, 1989), de uma maneira similar à forma que a crista ectodérmica apical (do original em inglês *apical ectodermal ridge*) tem um papel de indução no crescimento distal do broto do membro (Saunders, 1948; Gilbert, 2010). Assim, a formação da crista carapacial é ao menos um dos eventos ontogenéticos por trás do desenvolvimento da carapaça das tartarugas, sendo fundamental para o padrão de crescimento das costelas (Burke, 1991; Nagashima et al., 2007).

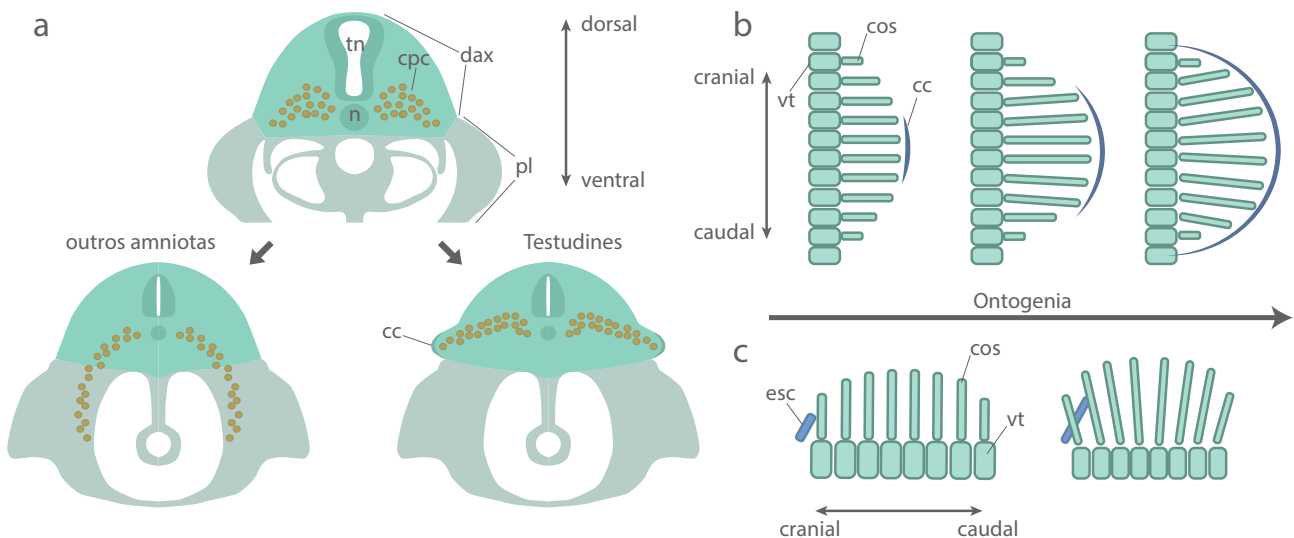


Figura 3. Desenvolvimento embrionário dos elementos da carapaça das tartarugas. (a) ilustrações de cortes transversais de embriões amniotas. (b) esquema do desenvolvimento da crista carapacial e sua relação com a disposição das costelas. Notar o efeito de leque induzido pelo crescimento das costelas em direção à crista carapacial. (c) esquema da posição relativa da cintura escapular em relação às costelas. Notar o efeito do espalhamento cranial das costelas cobrindo a cintura escapular dorsalmente. Abreviações: *cc*, crista carapacial; *cos*, costelas; *cpc*, células precursoras das costelas; *dax*, domínio axial do corpo embrionário; *esc*, cintura escapular; *n*, notocorda; *pl*, parede lateral do corpo embrionário; *vt*, vértebras trunciais; *tn*, tubo neural. Figura modificada de Nagashima et al., 2007 e 2012.

A crista carapacial também é responsável pela posição atípica da cintura escapular em tartarugas em comparação com outros amniotas. Esta é usualmente posicionada dorsal ou cranialmente às costelas torácicas, enquanto que nas tartarugas ela é ventral às costelas (Lyson e Joyce, 2012) (Fig. 3c). A crista carapacial redireciona o crescimento das costelas resultando em um padrão em formato de leque (Fig. 3b) (Burke, 1989; 1991; Nagashima et al., 2007; 2015). Em embriões precoces de *Pelodiscus sinensis* o primórdio da escápula é localizado cranialmente às costelas e, mais tarde na ontogenia, quando a crista carapacial faz com que as costelas craniais se espalhem cranialmente, estas cobrem a cintura escapular dorsalmente (Fig. 3c), resultando no padrão “ao avesso” nas tartarugas (Nagashima et al., 2012).

A carapaça das tartarugas como uma novidade evolutiva

Se a crista carapacial é o evento ontogenético que resulta em uma nova estrutura, então podemos considerar a carapaça das tartarugas como uma novidade evolutiva? Como tal (Müller & Wagner, 1991), ela deveria possuir uma nova identidade (Wagner, 2007) que seja diferente daquela das costelas truncais de outros amniotas. Wagner (2007; 2014) argumentou que uma nova *identidade* de caráter é fundamentalmente diferente de um novo *estado* de caráter e, assim, devem existir mecanismos moleculares diferentes que determinam cada um deles.

Considerando a variedade de fenótipos em diferentes táxons de tartarugas, se a carapaça é realmente uma novidade evolutiva devem existir conjuntos diferentes de genes expressos em tartarugas que possuem todos os elementos de uma carapaça completa (Fig. 1a), incluindo os componentes endo- e exoesqueletais (i.e. tartarugas com “casco duro” ou casco completo) e nas que possuem uma carapaça reduzida, composta apenas de elementos endoesqueletais (i.e. tartarugas-de-casco-mole). Além disso, esperaríamos também encontrar outro conjunto de genes sendo expressos comum a estes dois tipos de casco de tartarugas, e que não seja encontrado em nenhum outro amniota. Por fim, se a crista carapacial é a estrutura ontogenética relacionada ao surgimento da carapaça nas tartarugas, os mecanismos que determinam a identidade desta novidade evolutiva deveriam ser relacionados a seu aparecimento.

Diversos estudos observaram os genes do desenvolvimento expressos na crista carapacial de *Trachemys scripta*, uma tartaruga de “casco duro” (Loredo et al., 2001; Moustakas, 2008; Hirasawa et al., 2015), e *Pelodiscus sinensis*, uma tartaruga-de-casco-mole (Kuraku et al., 2005; Hirasawa et al., 2015). Foi identificada a expressão dos genes *Sp-5*, *Crabp-1*, *Apcdd-1*, e *Lef-1* em ambos os táxons, e outros, como *Shh* e *Bmp4*, nos embriões de *T. scripta*, mas não nos de *P. sinensis* (Hirasawa et al., 2015). A expressão destes dois últimos genes está relacionada à diferenciação de estrutura tegumentares (Hirasawa et al., 2015) e pode estar relacionada ao desenvolvimento dos elementos exoesqueletais (e.g. periferais) da carapaça completa em tartarugas de casco duro, que são ausentes nas de casco mole.

O outro conjunto de genes regulatórios, compartilhado por todas as tartarugas, pode ser interpretado como parte da Rede de Identidade de Caráter, em inglês *Character Identity Network* (Wagner, 2007), que determina a identidade da carapaça das tartarugas.

Intrigantemente, do conjunto de genes compartilhados, *Sp-5* e *Apcdd-1* são regulados por *Lef-1*, que, juntamente com o cofator β -catenina, participa da via de sinalização Wnt da crista ectodérmica apical do broto do membro (Burke, 1989; Kuratani et al., 2011). Assim, este conjunto comum de genes, ou a rede genética regulatória (do original em inglês *gene regulatory network*; Wagner, 2007), encontrado na crista carapacial das tartarugas, pode ter sido adquirida pela cooptação parcial do programa de desenvolvimento dos membros, compartilhado por todos os tetrápodes (Burke, 1989; Kuratani et al., 2011), o que explicaria as semelhanças histológicas e morfológicas entre a crista carapacial e a crista ectodérmica apical do broto dos membros.

Os achados fósseis e o surgimento da carapaça

Por muito tempo as evidências paleontológicas (Cox, 1969; Lee, 1997; Joyce et al., 2009), ao contrário dos resultados ontogenéticos (Zangerl, 1939; Burke, 1989; Gilbert et al., 2001), sugeriram que a carapaça das tartarugas teria se formado de acordo com a hipótese de Carus (1834), ou seja, pela fusão das costelas e arcos vertebrais a ossificações dérmicas sobrejacentes, os osteodermos (Fig. 2c). Isto decorre do fato de que a tartaruga mais antiga reconhecida, *Proganochelys quenstedti*, do Triássico Tardio da Alemanha (aprox. 210 m.a.), já possuía uma carapaça completa, além de osteodermos espalhados no pescoço e cauda (Gaffney, 1990).

Contudo, a recente descoberta de *Odontochelys semitestacea* do Triássico Médio (aprox. 220 m.a.) da China (Li et al., 2008) contribuiu muito para a revisão destas antigas hipóteses. Devido à presença de um plastrão completamente desenvolvido este táxon foi prontamente aceito como parte da linhagem que leva às tartarugas atuais (Joyce, 2015). Seu achado fez com que *Eunotosaurus africanus*, um táxon do Permiano da África do Sul (aprox. 260 m.a.) descrito no final do século XIX (Seeley, 1892), mas esquecido por estudos subsequentes, fosse reinterpretado como parte desta mesma linhagem devido às semelhanças morfológicas com *O. semitestacea* (Lyson et al., 2013). Ainda mais recentemente, outro táxon fóssil descoberto no Triássico Médio da Alemanha (aprox. 240 m.a.), *Pappochelys rosinae* (Schoch e Sues, 2015), também foi posicionado nesta linhagem. Com isso, os dados paleontológicos passaram a preencher lacunas de como poderia ter se dado a história evolutiva do surgimento da carapaça e convergir com os resultados de estudos ontogenéticos.

De acordo com as análises filogenéticas que incluem estes táxons fósseis (Lyson et al., 2013; Bever et al., 2015; Schoch e Sues, 2015), *Eunotosaurus africanus*, *Pappochelys rosinae* e *Odontochelys semitestacea* são táxons-irmãos sucessivos de Testudinata, o clado das tartarugas com casco completo (Fig. 4). Neste cenário, a expansão crânio-caudal das costelas, identificada por Hirasawa et al. (2013) em

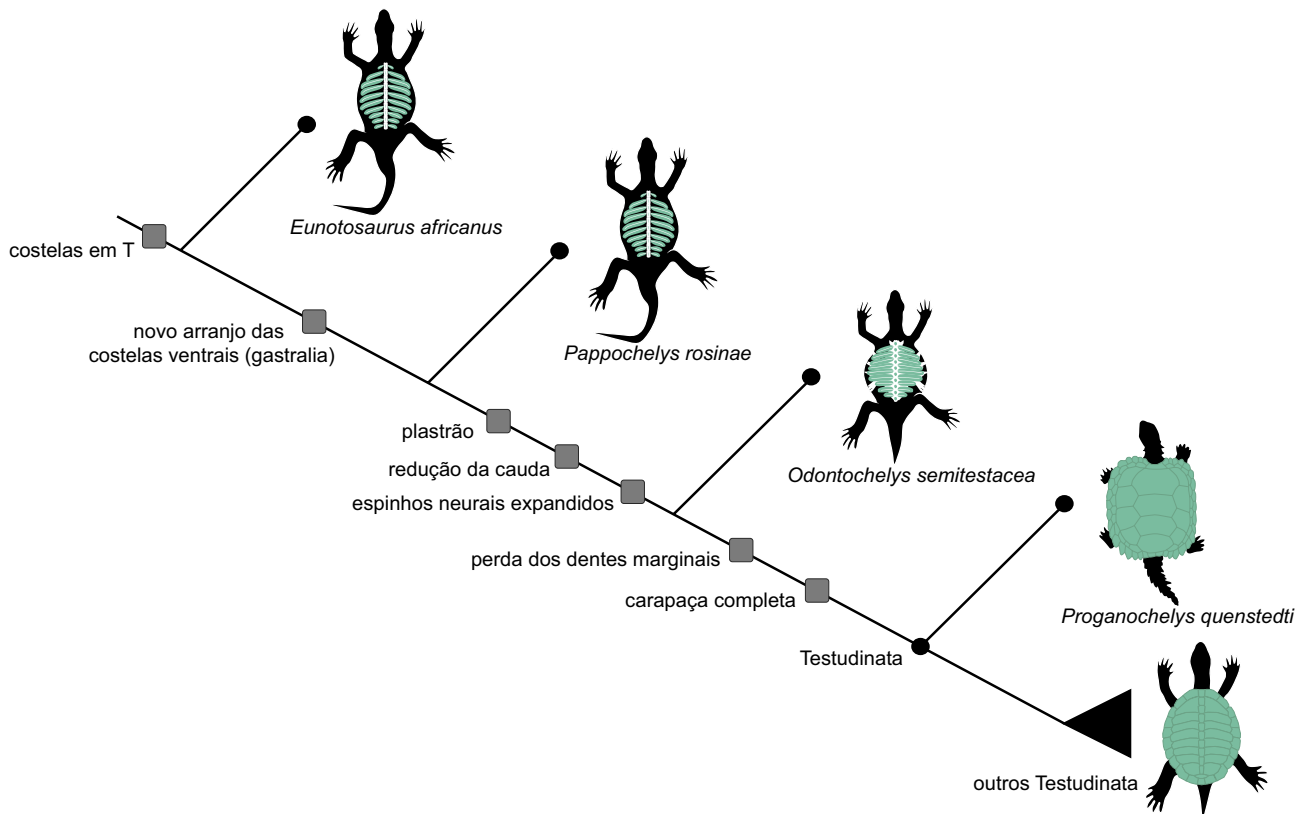


Figura 4. Hipótese sobre as relações filogenéticas e modificações no plano corporal na linhagem que leva aos Testudinata. Os quadrados cinza representam o surgimento de modificações posicionados na árvore filogenética do grupo.

embriões de *Pelodiscus sinensis*, já ocorreria em *E. africanus* e *P. rosinae*, como evidenciado pelas costelas expandidas em forma de T identificadas nestes táxons (Lyson et al., 2013; Schoch e Sues, 2015).

Entretanto, o passo ontogenético mais drástico em direção à carapaça das tartarugas, o surgimento da crista carapacial e o sequestro axial das costelas, ocorreria mais tarde (Fig. 4). Ao menos um primórdio da crista carapacial deve ter estado presente em *Odontochelys semitestacea* (Nagashima et al., 2009) uma vez que suas costelas não adentram a parede lateral do corpo, sendo horizontalizadas (Li et al., 2008). Ao mesmo tempo, esta crista carapacial deve ter sido efêmera ou parcial, uma vez que o padrão de leque das costelas observado nas tartarugas atuais não é reconhecido em *O. semitestacea*, o que também resulta em uma topografia da cintura escapular similar aos demais amniotas, i.e. cranial às costelas trunciais (Li et al., 2008; Nagashima et al., 2009; Kuratani et al., 2011).

Por fim, nenhum destes novos achados fósseis possui osteodermos, desfavorecendo mais uma vez as hipóteses de origem composta (Fig. 2b) da carapaça das tartarugas (Joyce, 2015). O surgimento da carapaça completa de tartaruga, com a incorporação dos elementos dérmicos presentes nas tartarugas atuais, teria se dado somente no clado Testudinata (Fig. 4), como observado em *Proganochelys quenstedti* (Gaffney, 1990). Assim, somente depois do surgimento da crista carapacial e do sequestro axial das costelas, as modificações mais profundas do plano corporal na linhagem das tartarugas, é que os elementos exoesqueléticos teriam sido incorporados à estrutura característica deste clado.

Conclusão

A carapaça das tartarugas é uma inovação evolutiva que, de forma similar aos tagmas dos artrópodes (Müller e Wagner, 1991), é composta de elementos anatômicos presente em seus ancestrais, mas modificados e integrados de tal forma que as relações de homologia com qualquer outra estrutura presente em outros amniotas parece difícil de se propor. O mecanismo de desenvolvimento responsável pela identidade desta nova estrutura (Wagner, 2007) parece ter sido adquirido pela cooptação parcial de um mecanismo molecular já existente relacionado à formação do broto do membro tetrápode (Burke, 1989; Kuratani et al., 2011; Hirasawa et al., 2015). Os recentes achados fósseis (Li et al., 2008; Lyson et al., 2013; Bever et al., 2015; Schoch e Sues, 2015) permitem um melhor entendimento de como essa transformação no plano corporal das tartarugas teria se dado ao longo da história filogenética desta linhagem (Joyce, 2015). Por muito tempo consideradas uma incógnita entre os tetrápodes, com morfologia de difícil compreensão e relações filogenéticas controversas, os estudos mais recentes vem melhorando nossa compreensão do que são e como surgiram as tartarugas e sua carapaça. Estes resultados demonstram a importância da incorporação de dados de naturezas distintas, como ontogenéticos e paleontológicos, na resolução de problemas complexos no contexto da biologia evolutiva moderna.

Agradecimentos

Essa revisão partiu da elaboração de um texto para a disciplina 5925900 “Homologia, Genes e Inovação Evolutiva”, ministrada por Günter P. Wagner e Tiana Kohlsdorf

no PPG em Biologia Comparada, da FFCLRP, USP, em Ribeirão Preto, aos quais agradeço enormemente. Agradeço também aos revisores e editores da Revista da Biologia e a Gabriela R. Duarte e Mariela C. Castro pelas revisões e dicas que tornaram o texto mais completo e de agradável leitura. As ideias desta publicação foram desenvolvidas durante a execução do meu projeto de doutorado, financiado pela FAPESP 2014/25379-5.

Referências

- Bever GS, Lyson TR, Field DJ, Bhullar B-AS. 2015. Evolutionary origin of the turtle skull. *Nature* 525(7568):239-242.
- Burke AC. 1989. Development of the turtle carapace: implications for the evolution of a novel bauplan. *Journal of Morphology* 199:363-378.
- Burke AC. 1991. The development and evolution of the turtle body plan. Inferring intrinsic aspects of the evolutionary process from experimental embryology. *American Zoologist* 31:616-627.
- Carus KG. 1834. *Lehrbuch der Vergleichenden Zootomie*, vol 1, 2nd edn. Leipzig: Fleischer.
- Cox CB. 1969. The problematic Permian reptile Eunosaurus. *Bulletin of the British Museum of Natural History* 18:165-196.
- Cuvier G. 1799. *Leçons d'anatomie comparée*, Tome I. Paris: Baudouin, Imprimeur de L'Institut National des Sciences et des Arts. Cuvier 1825.
- Gaffney ES. 1990. The comparative osteology of the Triassic turtle Proganochelys. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 194:1-263.
- Gilbert SF. 2010. *Developmental Biology*. 9ª edição. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Gilbert SF, Loredó GA, Brukman A, Burke AC. 2001. Morphogenesis of the turtle shell: the development of a novel structure in tetrapod evolution. *Evolution & Development* 3:47-58.
- Hirasawa T, Nagashima H, Kuratani S. 2013. The endoskeletal origin of the turtle carapace. *Nature Communications* 4:2107.
- Hirasawa T, Pascual-Anaya J, Kamekazi N, Taniguchi M, Mine K, Kuratani S. 2015. The evolutionary origin of the turtle shell and its dependence on the axial arrest of the embryonic rib cage. *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)* 324B:194-207.
- Joyce WG. 2015. The origin of turtles: a paleontological perspective. *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)*. 324B:181-193.
- Joyce WG, Lucas SG, Scheyer TM, Heckert AB, Hunt AP. 2009. A thin-shelled reptile from the Late Triassic of North America and the origin of the turtle shell. *Proceedings of the Royal Society B* 276:507-513.
- Kuraku S, Usuda R, Kuratani S. 2005. Comprehensive survey of carapacial ridge-specific genes in turtle implies co-option of some regulatory genes in carapace evolution. *Evolution & Development* 7:3-17.
- Kuratani S, Kuraku S, Nagashima H. 2011. Evolutionary developmental perspective for the origin of turtles: the folding theory for the shell based on the developmental nature of the carapacial ridge. *Evolution & Development* 13:1-14.
- Lee MSY. 1997. Pareiasaur phylogeny and the origin of turtles. *Zoological Journal of the Linnean Society* 120:197-280.
- Li C, Wu XC, Rieppel O, Wang TL, Zhao LJ. 2008. Ancestral turtle from the late Triassic of southwestern China. *Nature* 456:497-501.
- Loredó GA, Brukman A, Harris MP, Kagle D, et al., Gilbert SF. 2001. Development of an evolutionarily novel structure: fibroblast growth factor expression in the carapacial ridge of turtle embryos. *Journal of Experimental Zoology* 291A:274-281.
- Lyson TR, Joyce WG. 2012. Evolution of the turtle bauplan: the topological relationship of the scapula relative to the ribcage. *Biology Letters* 8:1028-1031.
- Lyson TR, Bever GS, Scheyer TM, Hsiang AY, Gauthier JA. 2013. Evolutionary origin of the turtle shell. *Current Biology* 23:1113-1119.
- Meckel JF. 1824. *System der Vergleichenden Anatomie*. Teil. 2. Abth. 1. Halle: Renger.
- Moustakas JE. 2008. Development of the carapacial ridge: implications for the evolution of genetic networks in turtle shell development. *Evolution & Development* 10:29-36.
- Müller GB, Wagner GP. 1991. Novelty in evolution: restructuring the concept. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22:229-256.
- Nagashima H, Kuraku S, Uchida K, Ohya YL, Narita Y, Kuratani S. 2007. On the carapacial ridge in turtle embryos: its developmental origin, function and the chelonian body plan. *Development* 134:2219-2226.
- Nagashima H, Sugahara F, Takechi M, Sato N, Kuratani S. 2015. On the homology of the shoulder girdle in turtles. *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)* 324B:244-254.
- Nagashima H, Sugahara F, Takechi M, Ericsson R, Kawashima-Ohya Y, Narita Y, Kuratani S. 2009. Evolution of the turtle body plan by the folding and creation of new muscle connections. *Science* 325:193-196.
- Nagashima H, Kuraku S, Uchida K, Kawashima-Ohya Y, Narita Y, Kuratani S. 2012. Body plan of turtles: an anatomical, developmental and evolutionary perspective. *Anatomical Science International* 87:1-13.
- Saint-Hilaire G. 1809. Sur les tortues molles, nouveau genre sous le nom de Trionyx, et sur la formation des carapaces. *Annales Muséum National D'Histoire Naturelle Paris* 14:1-20.
- Saunders JW Jr. 1948. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *Journal of Experimental Zoology* 108:363-403.
- Scheyer TM, Brüllmann B, Sánchez-Villagra MR. 2008. The ontogeny of the shell in side-necked turtles, with emphasis on the homologies of costal and neural bones. *Journal of Morphology* 269:1008-1021.
- Schoch RR, Sues H-D. 2015. A Middle Triassic stem-turtle and the evolution of turtle body plan. *Nature* 523(7562):584-587.
- Seeley HG. 1892. On a new reptile from Welte Vreden (Beaufort West), Eunosaurus africanus (Seeley). *The Quaternary Journal of the Geological Society of London* 47:583-585.
- Vallén E. 1924. Beiträge zur Kenntnis der Ontogenie und der vergleichenden Anatomie des Schildkrötenpanzers. *Acta Zoologica* 23:1-127.
- Wagner GP, Lynch VJ. 2010. Evolutionary novelties. *Current Biology* 20(2):48-52.
- Wagner GP. 2007. The developmental genetics of homology. *Nature Reviews* 8:473-479.
- Wagner GP. 2014. *Homology, genes, and evolutionary innovation*. Princeton University Press.
- Zangerl R. 1939. The homology of the shell elements in turtles. *Journal of Morphology* 65:383-409.

Ilustração científica na Biologia: aplicação das técnicas de lápis de cor, nanquim (pontilhismo) e grafite

Scientific illustration in Biology: techniques of color pencil, china ink (pointillism) and graphite

Vitória Sabino Rapatão¹ e Douglas Fernando Peiró^{2*}

¹Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Araraquara-UNIARA, Araraquara/SP

²Laboratório de Biologia Aquática-Crustáceos, Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Araraquara-UNIARA, Araraquara/SP

*Contato: douglaspeiro@hotmail.com

Resumo. A ilustração científica é uma técnica de cinco séculos, que enquadra naturalistas, biólogos, médicos e outros cientistas. Ao contrário de reproduções exclusivamente artísticas, as ilustrações científicas preocupam-se em contar uma história, em descrever uma realidade, inserindo cortes, perspectivas variadas e anotações explicativas. Neste trabalho, pretendeu-se exemplificar três tipos de técnicas da ilustração científica na área das Ciências Biológicas. Para isso foram utilizados os seguintes materiais/técnicas: lápis de cor, nanquim (técnica do pontilhismo) e grafite. No total, são apresentadas seis ilustrações, duas para cada técnica, sendo de três animais e de três plantas. Hoje em dia existem pouquíssimos recursos de se retratar a natureza que se comparam a ilustração científica. Pois, por meio dela há mecanismos de se representar estruturas, detalhes e anotações, que em outros métodos não são possíveis.

Palavras-chave. Ilustração; Técnicas de ilustração; Desenho científico; Animais; Plantas.

Abstract. Scientific illustration is a technique of five centuries, including naturalists, biologists, physicians and other scientists. Unlike art reproductions, scientific illustrations are concerned to tell a history, describing the reality, including varied perspectives and explanatory notes. The aim of this study was exemplify three types of scientific illustration techniques in Biological Sciences. For this, we used the materials/techniques: colored pencils, china ink (pointillism technique) and graphite. In total, we present here six illustrations, two for each technique, with three animals and three plants. Nowadays there are very few resources to portray the nature as scientific illustration does. Because it uses their own mechanisms to represent structures, details and notes, that in other methods are not possible.

Keywords. Illustration; Illustration techniques; Scientific drawing; Animals; Plants.

Introdução

Desde os primórdios da humanidade, a ilustração é utilizada para representar aspectos visuais de animais, plantas, humanos, tecidos corporais entre outras estruturas biológicas. Entre os homens pré-históricos, parte da comunicação era feita a partir de desenhos rudimentares nas paredes de cavernas, representando animais, pessoas e vegetação. Com a evolução da sociedade e dos métodos, surge então a chamada ilustração científica, uma técnica que remonta cinco séculos que une várias áreas do conhecimento humano. É uma modalidade especializada, que enquadra naturalistas, médicos, biólogos e outros cientistas (Suguituru e Morini, 2010).

Na passagem do século XV para o XVI, as grandes viagens navais de descobertas e exploração colonial contribuíram para a evolução dessa técnica. Exploradores e naturalistas (que acompanhavam estas viagens) descreviam os animais, plantas e outros seres vivos (Barbosa-Sil-

va, 2009) e, para isso, utilizavam técnicas de ilustração que pudessem mostrar forma, cor e aspecto dos retratados. Ao contrário de reproduções artísticas, as ilustrações científicas preocupam-se em contar uma história, em descrever uma realidade, inserindo cortes, perspectivas variadas e anotações explicativas (Pereira, 2006). Com o desenvolvimento das técnicas de perspectiva e profundidade, o impressionante realismo das obras e a ampliação das técnicas de sombreamento com luz e sombra, deram à ilustração aspectos inigualáveis, possibilitando mostrar o que não é facilmente observado (Correia, 2011).

A ilustração científica pode ser uma importante aliada na construção e dispersão do saber, demonstrando que é uma ferramenta útil e fácil no processo de aprendizagem e investigação, seja para o especialista ou para um público leigo (Correia, 2011). Com o tempo, essa técnica se desenvolveu, possibilitando o uso de metodologias diferentes, podendo ser desde um simples desenho em grafite, até os

Recebido: 28abr16

Aceito: 09jun16

Publicado: 05jul16

Editado por
Arthur S. C. França
e revisado por
Wellington Lobato
Júnior

mais sofisticados modelos de animações feitos com computação gráfica (Suguituru e Morini, 2010).

Para um ilustrador científico do mundo natural, é preciso conhecer tanto a parte relacionada às técnicas de ilustração, como a parte relacionada às ciências biológicas. É preciso pesquisar, conhecer o nome científico e popular, características e classificação sistemática dos seres vivos. É um trabalho que consiste na representação fiel de um material biológico determinado, respeitando-se todas as medidas, dimensões e contraste de cores, mesmo que retratado em preto e branco (Araújo, 2009). Na ilustração, aprender as técnicas é fundamental e, toda obra utiliza certo nível de conhecimento para poder transmitir essa mensagem. O conhecimento técnico permite a escolha correta de materiais para preparar o trabalho, com a segurança de que terá o nível de excelência esperado (Liddle, 1982).

A ilustração científica é o resultado da união de várias fontes de informação, como: observação no campo, fotografias, coleções de museu, conversas com especialistas e pesquisas bibliográficas. Também, para alguns autores, pode ser definida como uma área das artes plásticas cuja finalidade é auxiliar o pesquisador a comunicar suas ideias e descobertas. As várias técnicas disponíveis permitem ao usuário a elaboração de imagens claras, objetivas e ao mesmo tempo cativantes (Ito et al., 2010).

Dentre as principais técnicas/materiais utilizados na ilustração científica estão os mencionados a seguir: O lápis de cor, método bastante utilizado devido a qualidade de resultados com cores. Considerado uma técnica difícil, mesmo para ilustradores profissionais, o desenho a lápis de cor exige um grande domínio na mistura de cores, no sombreado, nos contornos e preenchimentos (Glossário de Técnicas Artísticas, 2015); O nanquim, um material muito utilizado para a escrita, desenho e pintura, é um dos principais métodos utilizados na ilustração científica bio-

lógica (Araújo, 2009; Nanquim.com, 2015). Na ilustração com nanquim existe a técnica de hachuras, onde linhas paralelas ou cruzadas criam o sombreado na obra, e a técnica do pontilhismo (utilizada neste trabalho), em que vários pontos são feitos mais próximos ou mais afastados para criar o efeito de sombra e luz (Liddle, 1982); O grafite, que é a técnica mais elementar, com recursos limitados, permitindo, de acordo com a habilidade e o domínio técnico do executor, alcançar resultados notáveis por meio do uso de traços, manchas, granulações de tons, associados a recursos como esfuminhos e borrachas (Glossário de Técnicas Artísticas, 2015).

Este trabalho teve como objetivos aplicar três tipos de técnicas envolvidas na ilustração científica na área das ciências biológicas: o lápis de cor, o nanquim (técnica do pontilhismo) e grafite, ilustrando três animais (dois invertebrados e um vertebrado) e três plantas angiospermas (uma herbácea, uma arbústea e uma arbórea), com as diferentes técnicas propostas.

Técnicas de ilustração científica

Foram utilizados três animais, sendo dois invertebrados: o Caranguejo Baú *Calappa gallus* e a Borboleta Estaladeira *Hamadryas amphinome*; e um vertebrado: um indivíduo juvenil de Tartaruga de Couro *Dermochelys coriacea*. Também foram utilizadas três plantas angiospermas, sendo uma herbácea: a planta Azulzinha *Evolvulus glomeratus*; uma arbústea: a planta Primavera *Bougainvillea spectabilis*; e uma arbórea: a planta Jasmim Manga *Plumeria rubra*. Foram utilizados um animal e uma planta para cada uma das três técnicas de ilustração científica escolhidas: lápis de cor, nanquim (técnica do pontilhismo) e grafite. Para observação dos detalhes do material biológico foi utilizado um estereomicroscópio e uma lupa de mão. Para as ilustrações com as técnicas de lápis de cor e de grafite, foram utilizados papel do tipo 'canson' profissional. Para a

Figura 1. Borboleta Estaladeira *Hamadryas amphinome*, em vista dorsal, ilustrada com a técnica do lápis de cor. Nas asas há a predominância das cores preta e verde azulado, com manchas amareladas e também rosadas. No tórax há a predominância do preto, com manchas brancas. No abdome há manchas alaranjadas no contorno de cada segmento, no centro; e pontos brancos nas laterais.



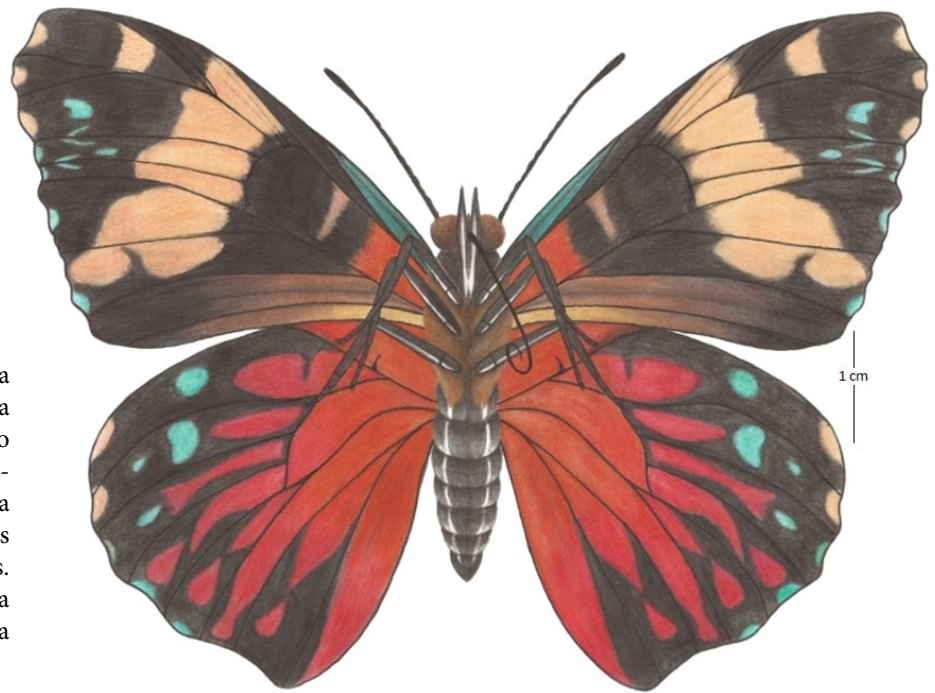


Figura 2. Borboleta Estaladeira *Hamadryas amphinome*, em vista ventral, ilustrada com a técnica do lápis de cor. Nas asas há a predominância das cores preta e vermelha alaranjada, com algumas manchas verde azuladas e também beges. No tórax há a presença de pelos na cor marrom, e o abdome têm uma coloração marrom escura.

técnica do nanquim (pontilhismo) foi realizado um estudo preliminar feito com lápis de grafite em papel sulfite, em seguida a versão final foi feita em nanquim, transposta em 'papel vegetal'. Os exemplares de animais utilizados são provenientes da Coleção de Crustáceos do Laboratório de Biologia Aquática-Crustáceos e da Coleção Zoológica Didática, ambas alocadas na Universidade de Araraquara-Uniara. As plantas foram coletadas no Clube Náutico de Araraquara e no Município de Santa Lúcia, no centro do Estado de São Paulo.

Lápis de Cor

O lápis de cor era um material pouco utilizado na ilustração científica, mas ao longo dos últimos anos se tornou um dos materiais de mais fácil acesso aos artistas. Essa técnica é ótima para representar as cores, devido a sua ampla gama de disponibilidades (Liddle, 1982). Para exemplificar a técnica do lápis de cor foi utilizada a Borboleta Estaladeira *Hamadryas amphinome* (Figuras 1 e 2), e a planta Primavera *Bougainvillea spectabilis* (Figura 3). O diferencial desta técnica está na fidelidade da representação das cores observadas no material biológico. Diferente das outras técnicas aqui utilizadas, a coloração pode trazer a ilustração um maior rigor e proximidade ao que é observado na natureza. Na borboleta, esta técnica pôde mostrar de uma forma muito detalhada a coloração de como ela realmente é. Na planta Primavera, o destaque se dá para as folhas modificadas (coloridas), cuja função é chamar a atenção de animais para a polinização, já que a flor (verdadeira) não é chamativa para polinizadores, por ser verde.

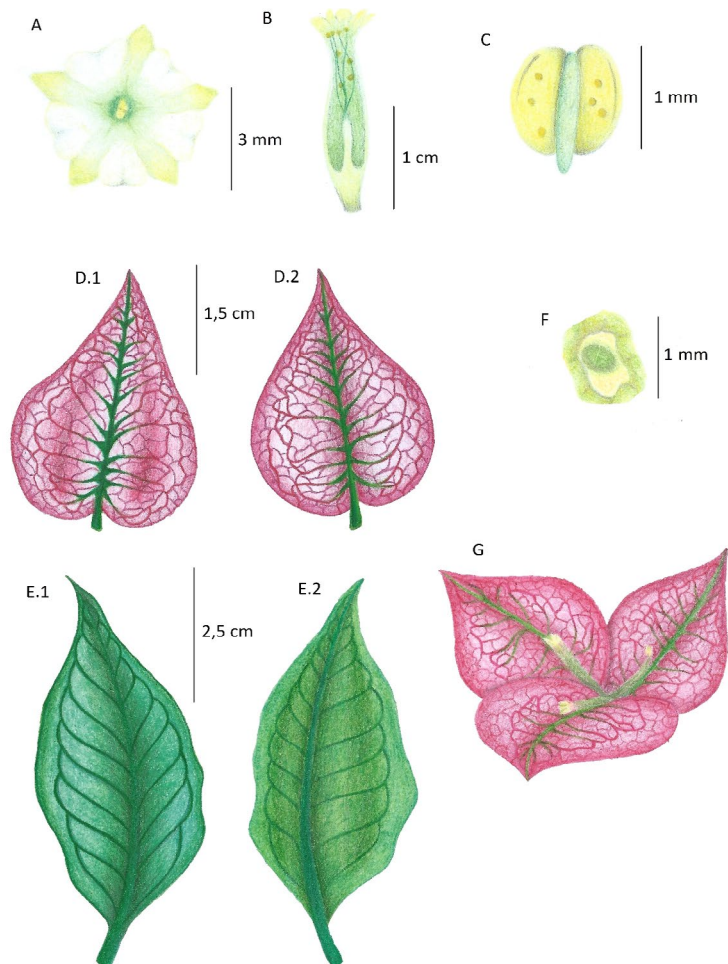


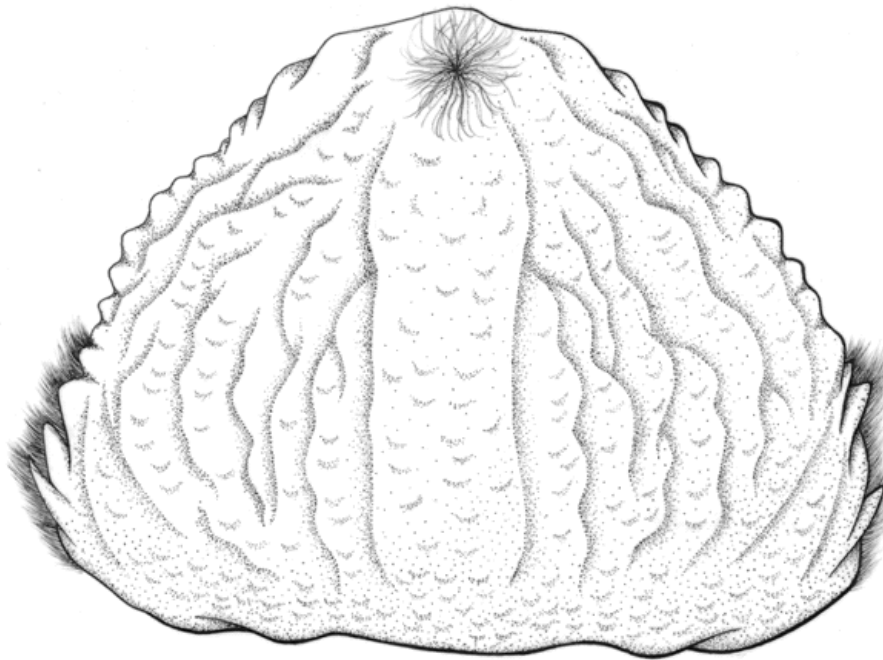
Figura 3. Planta Primavera *Bougainvillea spectabilis*, ilustrada com a técnica do lápis de cor. A. Vista superior da flor. B. Corte longitudinal do útero com o androceu (filete e antera) e gineceu (óvulo, estilete e estigma). C. Antera (androceu). D.1. Folha modificada em vista abaxial. D.2. Folha modificada em vista adaxial. E.1. Folha em vista adaxial. E.2. Folha em vista abaxial. F. Corte transversal do ovário. G. Flor disposta junto às folhas modificadas.

Nanquim (Técnica do Pontilhismo)

O nanquim é uma tinta criada na china, feita de carvão, goma laca bórax e água. Ela é excelente para reproduções de pontilhismo e de linhas, aplicada com materiais diversos como bico de pena, canetas recarregáveis ou descartáveis (Araújo, 2009). A técnica de pontilhismo usa, para representar sombras e áreas mais escuras, uma carga maior de pontos, e para representar uma região mais clara ou iluminação, uma carga menor ou nula de pontos.

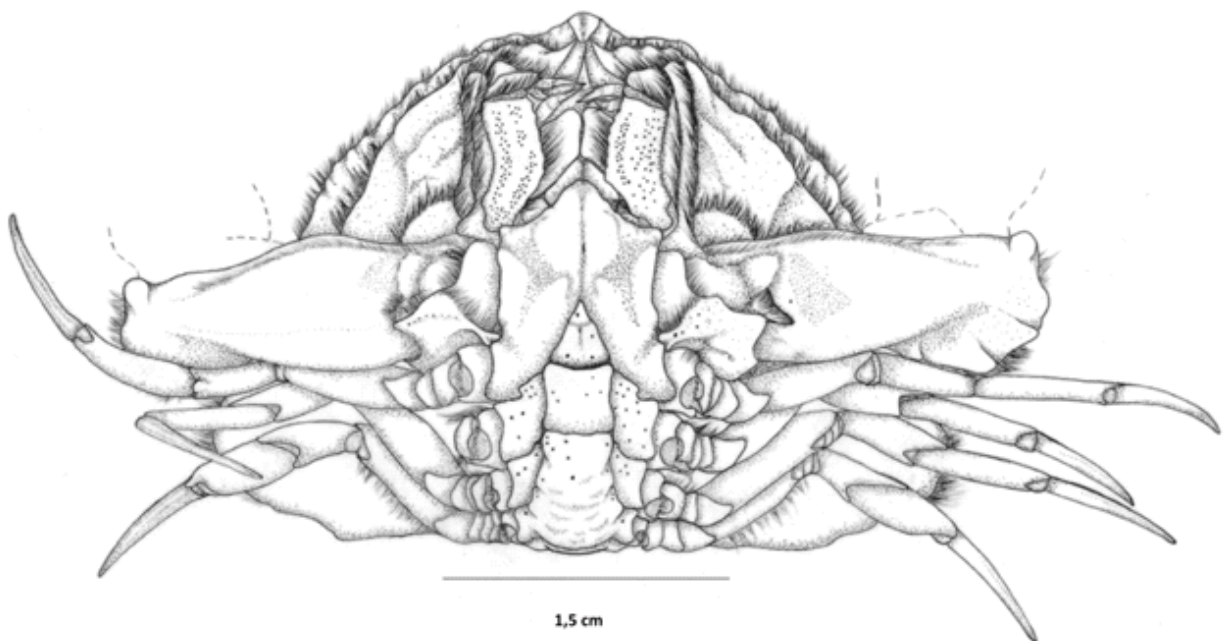
Para exemplificar a técnica do pontilhismo foi utilizado o Caranguejo Baú *Calappa gallus* (Figuras 4, 5 e

6), e a planta Azulzinha *Evolvulus glomeratus* (Figura 7). A intenção do pontilhismo é de ressaltar não somente as estruturas, mas também luz e sombra no material ilustrado. No caso do caranguejo, como não possui cores vivas, a técnica do nanquim reflete de maneira eficiente as suas estruturas e detalhes. Na planta Azulzinha, há algumas estruturas que não possuem cores, onde a representação da técnica de pontos trouxe uma nova forma de observação, ressaltando curvas e linhas de estruturas que a olho nu não é possível serem observadas.



1,5 cm

Figura 4. Carapaça do Caranguejo Baú *Calappa gallus* (indivíduo macho) em vista dorsal, ilustrado com a técnica do nanquim (pontilhismo). O animal possui a carapaça rígida com algumas ondulações e uma coloração marrom clara. Possui pelos curtos na lateral da carapaça.



1,5 cm

Figura 5. Carapaça do Caranguejo Baú *Calappa gallus* (indivíduo macho) em vista ventral, ilustrado com a técnica do nanquim (pontilhismo). Nesta ilustração está retratada a forma dos apêndices locomotores (pereiópodos), as partes bucais, abdômem rebatido abaixo do tórax, e uma parte dos quelípodos (coxa, base, ísquio e mero).

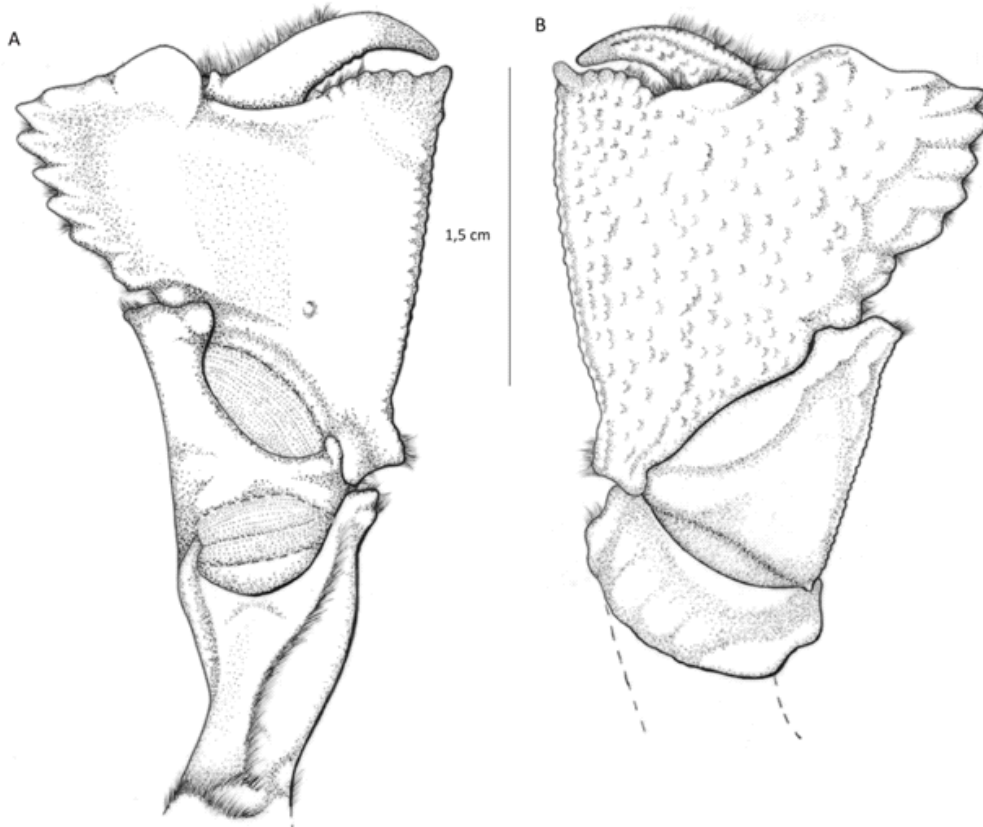


Figura 6. Quelípodos do Caranguejo *Calappa gallus* (indivíduo macho) ilustrado com a técnica do pontilhismo (nanquim). A. Vista ventral. B. Vista dorsal. Nesta ilustração estão representados os seguimentos: mero, carpo, palma, própodo, dedo móvel e dedo fixo.

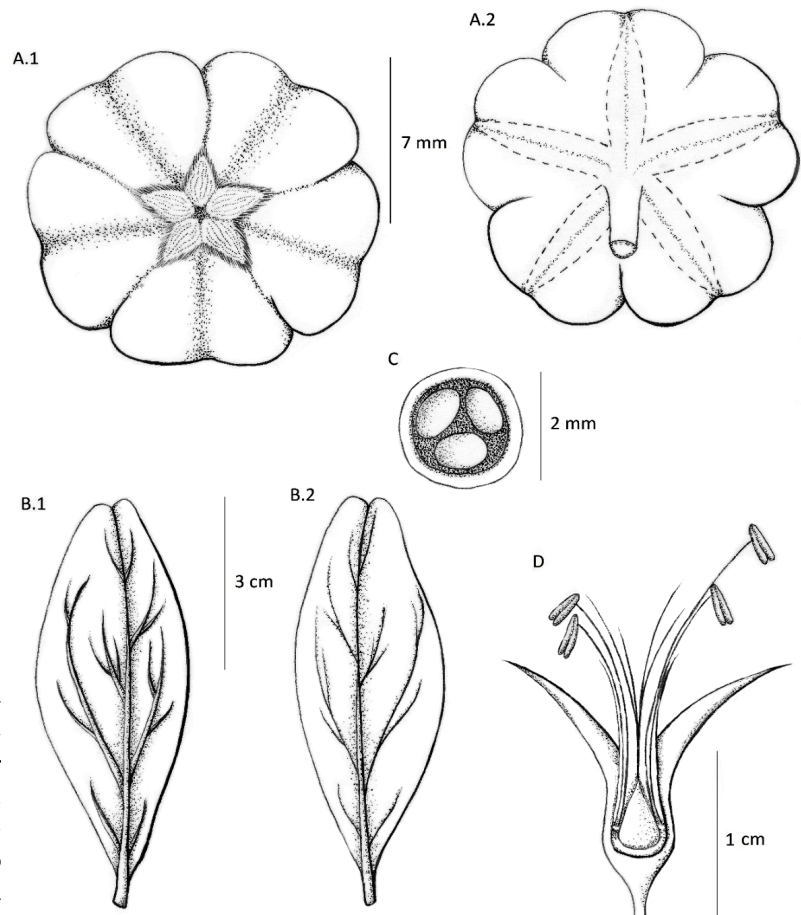


Figura 7. Planta Azulzinha *Evolvulus glomeratus*, ilustrada com a técnica do nanquim (pontilhismo). A.1. Flor em vista superior. A.2. Flor em vista inferior. B.1. Folha em vista abaxial. B.2. Folha em vista adaxial. C. Corte transversal do ovário. D. Corte longitudinal do útero com o androceu (filete e antera) e gineceu (óvulo, estilete e estigma).

Grafite

O grafite é um dos materiais mais acessíveis que o ilustrador pode utilizar, por ser facilmente transportado para o papel. Além disso, serve também como material para realização do esboço (Liddle, 1982) - ou também chamado: estudo - para posterior aplicação da técnica do nanquim. Há diferentes tipos de grafite, como por exemplo: com o corpo de madeira; e o integral, com o corpo é inteiramente de grafite (Araújo, 2009). Os grafites variam de intensidade e dureza, do mais mole (8B) ao mais duro (10H). Para fazer sombras e preenchimentos, os mais recomendados são F, B, 2B, 3B, 4B, 5B, 6B, 7B e 8B. Para traços e contornos finos, utiliza-se HB, H, 2H, 3H, 4H, 5H,

6H, 7H, 8H, 9H e 10H (Faber-Castel, 2014). Neste trabalho foram utilizados grafites com corpo de madeira e de corpo integral, nas intensidades 8B a 10H. Complementares à esta técnica, foram utilizados também: borrachas plásticas, limpa-tipos (borracha moldável) e esfuminho. A Tartaruga de Couro *Dermochelys coriacea* indivíduo juvenil (Figuras 8, 9 e 10) e a planta Jasmim Manga *Plumeria rubra* (Figura 11) foram ilustrados ucom grafite. Com esta técnica há a possibilidade de se destacar, de uma forma simples, todas as estruturas sem cores. São representados os traços que definem suas características externas, usando os contornos e preenchimentos, representando sombras e luz.

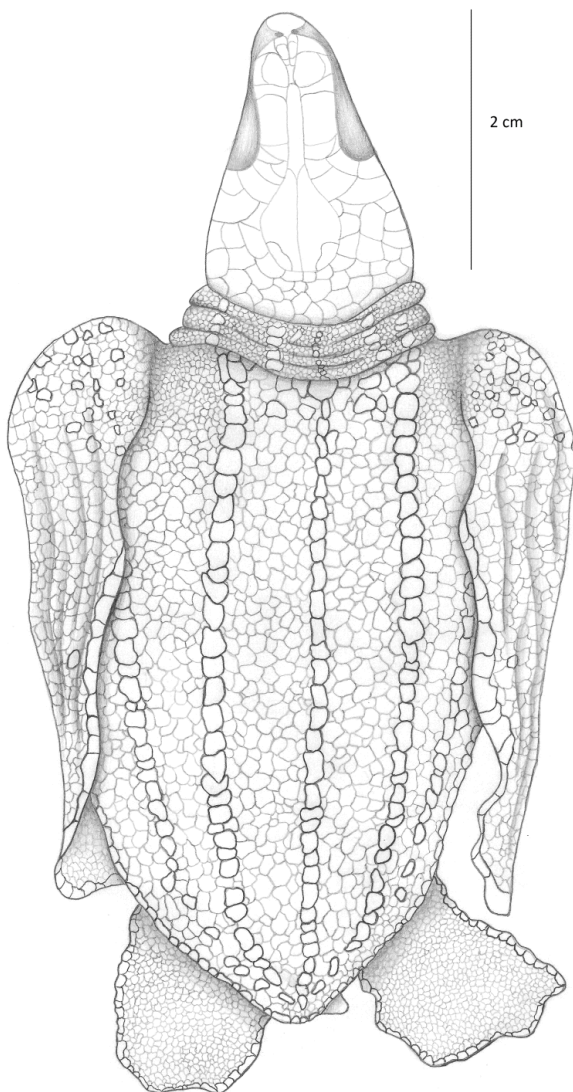


Figura 8. Tartaruga de Couro *Dermochelys coriacea* (indivíduo juvenil) em vista dorsal, ilustrada com a técnica do grafite. O animal possui placas ósseas nas cores preta e branca. A cor preta é predominante, e a branca está nas linhas de placas longitudinais da carapaça e nas bordas das nadadeiras. Na cabeça, a cor preta é predominante, possuindo somente algumas manchas esbranquiçadas. Na cabeça, também é possível visualizar que o limite dos olhos dá a impressão de 'se fundir' com uma parte escura que vai em direção das narinas.

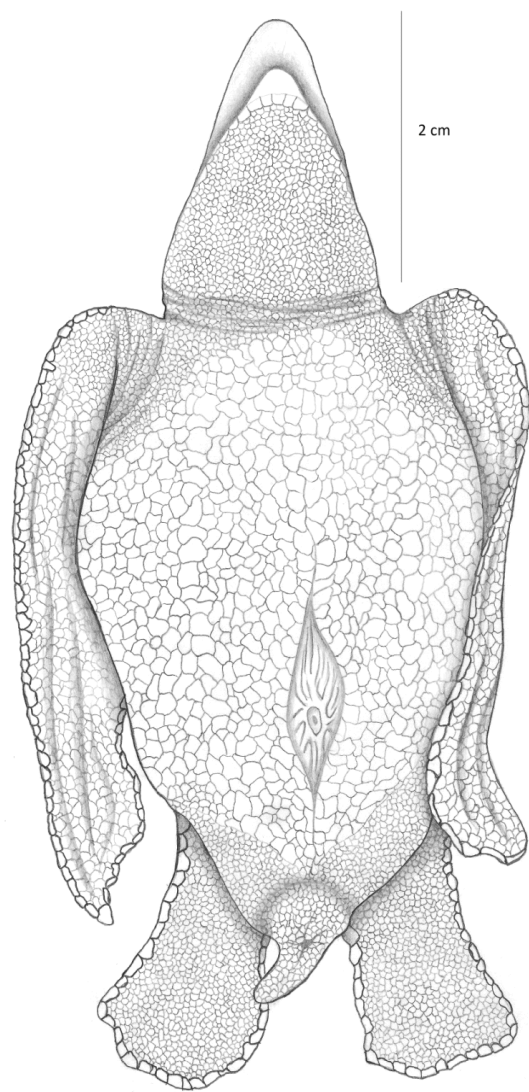


Figura 9. Tartaruga de Couro *Dermochelys coriacea* (indivíduo juvenil) em vista ventral, ilustrada com a técnica do grafite. O animal possui placas ósseas ao longo de todo o corpo, nas cores preta e branco amarelado. Nas nadadeiras, somente as placas das bordas são brancas. A cabeça possui um tom branco amarelado.

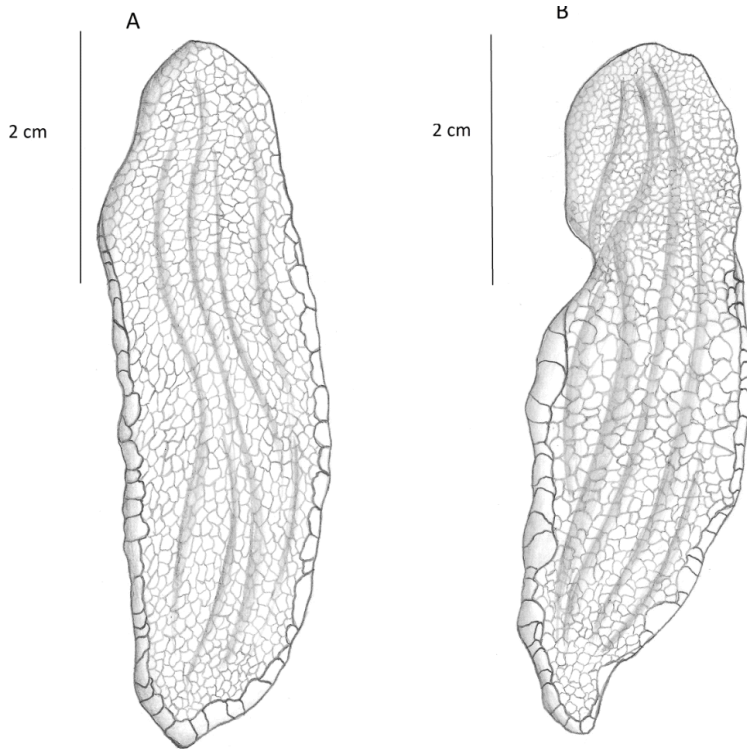


Figura 10. Nadadeira da Tartaruga de Couro *Dermodochelys coriacea* (indivíduo juvenil) ilustrada com a técnica do grafite. A. Vista dorsal, onde há predominância da cor preta. Somente as placas ósseas das bordas possuem a cor branca. B. Vista ventral, onde há predominância da cor preta. Somente as placas ósseas das bordas possuem a cor branca.

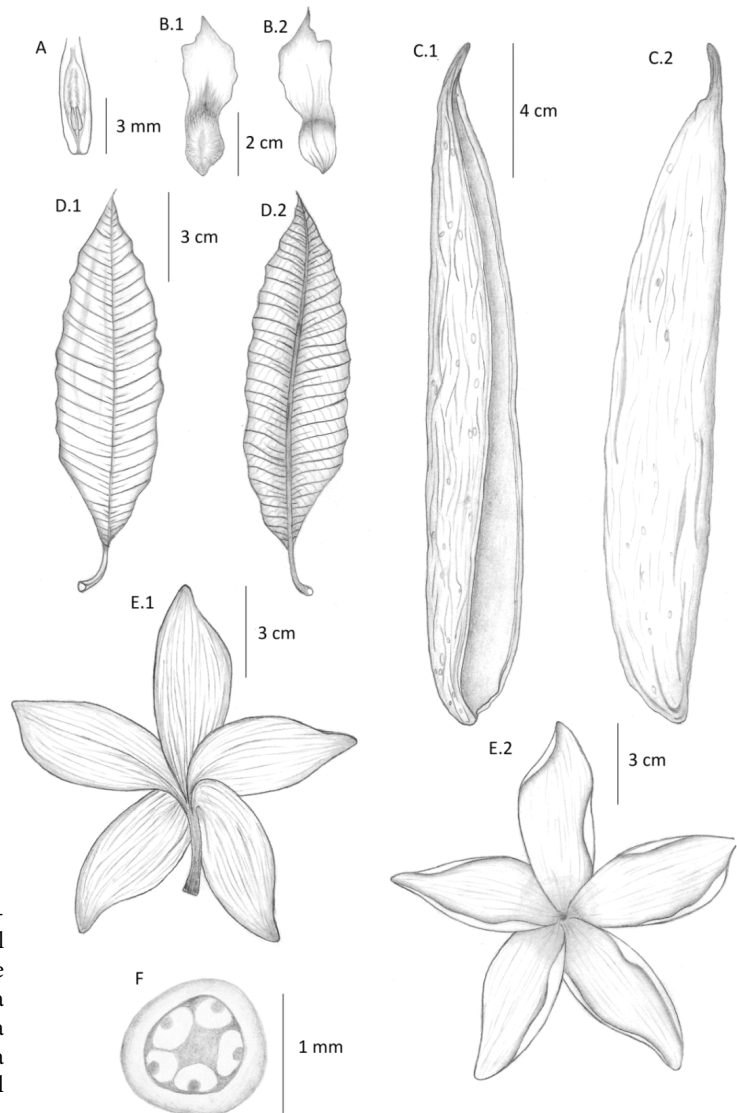


Figura 11. Planta Jasmim Manga *Plumeria rubra*, ilustrada com a técnica do grafite. A. Corte longitudinal do útero. B.1. Semente em vista lateral. B.2. Semente em vista lateral (oposta a anterior). C.1. Fruto em vista lateral. C.2. Fruto em vista lateral. D.1. Folha em vista adaxial. D.2. Folha em vista abaxial. E.1. Flor em vista inferior. E.2. Flor em vista superior. F. Corte transversal do ovário.

Considerações finais

Apesar da grande variedade de técnicas de ilustração científica (nem todas abordadas neste trabalho), cabe ao ilustrador aplicar o método que melhor representa o material de estudo a ser retratado. A ilustração científica utilizando a técnica do lápis de cor é uma representação gráfica fiel às cores do material de estudo, em muitos casos esta característica é importante para a identificação de espécies ou para a percepção de diferenças entre estruturas. A técnica do nanquim (pontilhismo) retrata fielmente as estruturas e relevos de um organismo, delimitando-as de maneira muito distinguível por meio de traços. Além disso, expressa de maneira satisfatória a luz e a sombra. A maioria dos taxônomos e/ou sistematistas optam pela a ilustração feita com esta técnica devido a fidelidade obtida com este recurso. A técnica do grafite não é muito frequente em estudos taxonômicos atuais, entretanto é amplamente utilizada para o estudo prévio (esboço) do material a ser ilustrado antes da aplicação da técnica do nanquim. Apesar de não ser frequente é, também, uma técnica eficiente na representação de estruturas, luz e sombras.

Por mais antiga que seja a técnica de ilustração e por mais tradicional que seja a arte de desenhar, não existem muitas técnicas modernas que possam retratar o que na ilustração científica é expressado de forma muito satisfatória. O essencial da ilustração científica é a fidelidade na retratação das estruturas e das cores (quando aplicadas) no desenho. Além disso, os olhos acurados do ilustrador (em muitos casos) podem enxergar mais do que as fotografias podem mostrar. O diferencial da ilustração científica é que nela pode-se mostrar várias formas e cortes de uma estrutura em um único desenho, podendo ressaltar as cores, os contornos, as separações de partes, além de conter anotações. Este trabalho não teve a intenção de esgotar todas as variadas técnicas disponíveis na ilustração científica, sendo assim recomendamos que os leitores busquem por outras fontes para este tema. Além disso, incentivamos que mais trabalhos descrevendo as diversas técnicas sejam publicados e divulgados.

Agradecimentos

Este artigo é parte do Trabalho de Conclusão de Curso e da Iniciação Científica de VSR. Agradecemos à

professora Dra. Teresa K. Muraoka, coordenadora do curso de Ciências Biológicas do Universidade de Araraquara-Uniara. Agradecemos à professora Ms. Ana Carolina Buzzo Marcondelli pela identificação das plantas, além das orientações sobre as estruturas das mesmas. Agradecemos ao biólogo, ilustrador científico, Ricardo Milanetti Degani, pelas sugestões e orientações relacionadas às ilustrações científicas. Agradecemos à professora Dra. Maria Aparecida R. de Lima Grande, presidente da Coordenação de Iniciação Científica da Uniara. DFP agradece ao CNPq pelo auxílio a pesquisa, processo: 462715/2014-0, MCTI/CNPQ/Universal.

Referências

- Araújo, A. 2009. Aplicações da ilustração científica em Ciências Biológicas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Barbosa-Silva, E.R. 2009. Imagens facilitam a compreensão da ciência. *Ciência e Cultura* 61(3): 64-65.
- Correia, F. 2011. A ilustração científica: "santuário" onde a arte e a ciência comungam. *Visualidades* 9(2): 221-239.
- Glossário de Técnicas Artísticas. 2015. O desenho: grafite e lápis de cor. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/napead/repositorio/objetos/glossario-tecnicas-artisticas/creditos.php>> Acesso em 15 de maio de 2015
- Ito, M.N.; Pereira, S.N.; Nakagaki, M.J.; Carvalho, M.E. 2010. A arte da ilustração científica manual em taxonomia zoológica. *Anais do Simpósio Brasil-Japão, Campo Grande-MS*.
- Liddle, B. 1982. Como pintar e desenhar: Técnicas. Livros São Paulo: Abril.
- Nanquim.com. Origem do nanquim (2015). Disponível em: <<http://nanquim.com.br/sobre-a-tinta-nanquim/>> Acesso em 12 de maio de 2015.
- Pereira, R.M.A. 2006. Gabinetes de curiosidades e os primórdios da ilustração científica. II Encontro de História da Arte - IFCH/UNICAMP: 407-413.
- Suguituru, S.S.; Morini, M.S.C. 2012. Arte e ciência: uso de diferentes técnicas de Ilustração científica. *Anais do XV Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Mogi das Cruzes*.
- Faber-Castel.com (2014). Como a dureza da mina grafite é expressa? Disponível em: <http://www.faber-castell.com.br/54340/Curiosidades/Curiosidades/Como-a-dureza-da-mina-grafite-expressa/fcv2_index.aspx> Acesso em 14 de maio 2014.

Nado forçado crônico diminui a ansiedade em camundongos

Chronic exposure to forced swimming decreases anxiety in mice

Arthur S. C. França^{1*}, Fabíola P. S. Rufino², Bruno Lobão Soares^{3,4} e Sidarta Ribeiro¹

¹Brain Institute, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

²Brazilian Institute of Environment and Natural Resources (IBAMA).

³Edmond and Lily Safra International Institute of Neuroscience of Natal (ELS-IINN), Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

⁴Departament of Biophysics and Pharmacology, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

*Contato: arthursergiof@neuro.ufrn.br

Resumo. Comportamentos de ansiedade têm sido relacionados ao estresse crônico em roedores e humanos. Em ratos, o teste de natação forçada (FST) é usado como uma tarefa de indução de estresse crônico. Aqui nós testamos a validade do FST como um indutor de ansiedade em camundongos. Dividimos os animais em dois grupos, FST (exposto ao FST durante 15 dias consecutivos) e controle (manipulação durante sessões semelhantes). O teste de labirinto em cruz elevado foi realizado durante o dia 16. Surpreendentemente, FST levou a uma diminuição nos parâmetros de ansiedade, incluindo o tempo e frequência nos braços abertos. Os resultados sugerem que FST crônico não promove a ansiedade em camundongos, mas leva à sua diminuição global. Este efeito pode estar relacionado aos benefícios do exercício leve, uma vez que os camundongos mostram mais capacidade de flutuação do que os ratos.

Palavras-chave. *Comportamentos de ansiedade; Labirinto em Cruz elevado; Exercício leve.*

Recebido: 23fev16

Aceito: 11jul16

Publicado: 11jul16

Editado por José Guilherme Chauí-Berlink e revisado por Elisa Mari Akagi Jordão e Thiago Paes de Barros De Luccia

Abstract. Anxiety-like behaviors have been related to chronic stress in rodents and humans. In rats, forced swimming test (FST) is used as a chronic stress-inducing task. Here we test the validity of FST as an anxiety inducer in mice. We divided animals in two groups, FST (exposed to FST for 15 consecutive days) and control (handled in similar sessions). Plus-maze test was performed during the day 16. Surprisingly, FST led to a decrease in the anxiety parameters, including time and frequency in open arms. The results suggest that chronic FST does not promote anxiety in mice, but rather leads its overall decrease. This effect may be related to benefits of mild exercise, since mice display more flotation capacity than rats.

Keywords. *Anxiety behaviors; Plus-Maze; Mild exercise.*

Introdução

Estresse agudo e crônico, oriundo do estresse social (Henriques-Alves and Queiroz, 2015; McEwen, 2012) ou de procedimentos comportamentais (Badowska-Szalewska e col., 2010; Deng e col., 2015; Linthorst e col., 2002; Sakakibara e col., 2005), vêm sendo relacionado a diversas mudanças de biomarcadores relacionados a plasticidade e neurotransmissores límbicos, (Badowska-Szalewska e col., 2010; Jiang e col., 2016; Leuner and Shors, 2013; Linthorst e col., 2002) que por sua vez também são relacionados a comportamentos de ansiedade e depressão (Campos e col., 2013; Deng e col., 2015; Jiang e col., 2016; Leuner and Shors, 2013).

A exposição repetida a fatores estressores agudos leva a respostas de estresse crônico em humanos e em animais (Qi e col., 2006). Em humanos, estressores crônicos podem produzir respostas não adaptativas que levam a desordens psicológicas, tais como desordens de ansiedade e depressão maior (Blanchard e col., 1993; Kozicz e col., 2008). Visando simular condições estressantes em huma-

nos, modelos animais de estresse vêm sendo testados a fim de produzir estados comportamentais comparáveis aos observados na nossa espécie (Qi e col., 2006).

O uso do teste de nado forçado (*Forced Swimming Test*, FST) para induzir estresse é amplamente usado em ratos (Badowska-Szalewska e col., 2010; Linthorst e col., 2002; Sakakibara e col., 2005). O nado forçado vem sendo relacionado (1) a mudanças nos níveis de fatores neurotróficos derivados do cérebro ("brain-derived neurotrophic factor", BDNF; Badowska-Szalewska e col., 2010), (2) a mudanças nos níveis de serotonina (Linthorst e col., 2002; Sakakibara e col., 2005) e (3) a diminuição nos níveis de ERK1/2 em regiões hipotalâmicas (Sakakibara e col., 2005). Embora o nado forçado seja classicamente usado para o estudo de modelos de depressão (Petit-Demouliere e col., 2004; Sakakibara e col., 2005), também foi relatado evidência direta de estresse induzido por nado forçado relacionado com comportamento de ansiedade em ratos (Habr e col., 2014).

Visando investigar em camundongos o link estabelecido entre nado forçado e comportamentos de ansiedade em ratos, submetemos os camundongos ao nado forçado cronicamente e ao final do protocolo o labirinto de cruz elevado foi utilizado para avaliar os comportamentos de ansiedade (Dawson and Tricklebank, 1995; Kheirbek e col., 2013; Lister, 1987; Pellow e col., 1985). Os resultados encontrados no presente trabalho mostram que os animais submetidos ao nado forçado crônico apresentam aumento no tempo gasto explorando os braços abertos no labirinto de cruz elevado, comportamento classicamente relacionado a menor ansiedade em roedores. Nós encontramos também uma forte tendência no aumento de comportamento de avaliação de risco *Flat-back approach* (FBA) e *head dipping* (mergulho), também relacionado a diminuição de ansiedade. Nossos resultados sugerem que nado forçado crônico não promove ansiedade em camundongos, pelo contrário, leva a diminuição da ansiedade.

Materiais e métodos

Animais

Camundongos adultos do tipo “Swiss” (n = 16) foram mantidos num ciclo de 12 horas de claro/escuro (luzes ligadas às 6 horas) e a temperatura foi mantida em $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Todos os animais tiveram acesso à água e ração à vontade. Todos os procedimentos comportamentais estiveram em concordância com procedimentos de ética animal recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Grupos Comportamentais

Os animais foram separados em dois grupos: (1) Grupo Nado Forçado (FST), no qual os animais foram expostos ao procedimento de nado forçado crônico, teste classicamente usado para induzir estresse crônico e depressão (Petit-Demouliere e col., 2004, Porsolt e col., 1977) e (2) Grupo Controle, no qual os animais foram expostos somente a manipulação. Submetemos o grupo FST ao nado forçado em cilindros individuais de vidro (20 cm de altura, 15 cm de diâmetro) preenchidos com água ($24-27^\circ\text{C}$) até a 16 cm de altura. Cada camundongo (n = 6) foi colocado individualmente no cilindro e posteriormente forçado a nadar por 5 minutos uma vez ao dia por 15 dias consecutivos. Os animais do Grupo Controle (n=8) foram submetidos a 5 minutos de manipulação pelo experimentador uma vez ao dia por 15 dias consecutivos. Todos os procedimentos foram conduzidos entre as 08:00 e 16:00 horas para evitar mudanças no comportamento induzidos pelo ciclo claro/escuro. Os camundongos foram pesados no primeiro e último dia de procedimento a fim de verificar possíveis perdas de peso relacionadas ao estresse crônico e a diminuição de ingestão de comida. Durante o dia 16 ambos os grupos foram submetidos a avaliações em parâmetros de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado.

Labirinto em Cruz Elevado

A tarefa comportamental para acessar comportamentos de ansiedade no presente trabalho foi o labirinto

em cruz elevado (Dawson and Tricklebank, 1995; Kheirbek e col., 2013; Lister, 1987; Pellow e col., 1985), esse teste é baseado no comportamento natural dos roedores de evitar espaços abertos e altos (Pellow e col., 1985). Os parâmetros comportamentais de ansiedades avaliados no labirinto em cruz elevado foram (1) a frequências de entrada nos braços abertos, fechados e centro; (2) tempo de exploração nos braços abertos, fechados e centro; (3) frequência de mergulhos (*head dipping*) nos braços abertos (Dawson and Tricklebank, 1995; Kheirbek e col., 2013; Lister, 1987; Pellow e col., 1985) e comportamento de avaliação de risco relacionado a ansiedade no paradigma do labirinto em cruz elevado (Carola e col., 2002; Walf and Frye, 2007); (4) frequência de *grooming*; (5) frequência de aproximação com cautela (*flat-back approach*). Nós rastreamos e contabilizamos automaticamente a frequência de entrada e os tempos gastos nos braços usando o software Anymaze (Stoelting Co. USA). Os comportamentos foram contabilizados cegamente por um experimentador treinado usando o software Anymaze.

Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o Graphpad Prism. Inicialmente estabelecemos se os dados possuíam distribuição normal e variância homogênea com o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para as comparações entre os grupos Controle e FST, os dados que apresentaram distribuição normal foram comparados por teste t não pareado e os dados sem distribuição normal comparados com o teste de Mann-Whitney. Para as comparações do peso dos animais, aplicamos comparações multivariadas devido ao número de variáveis independentes. Então, nós usamos o teste ANOVA de duas vias, sendo o tempo (dia 1 vs dia 15) e o tratamento (Controle vs FST) como variáveis independentes e o peso em gramas como variável dependente. Nós provemos como estatística descritiva a média \pm Erro, número de animais por grupo e o valor de p.

Durante os procedimentos experimentais dois dos animais caíram ao explorar os braços abertos e foram retirados das análises estatísticas diminuindo o número de animais do grupo FST de 8 para 6.

Resultados

Peso corporal

Primeiro, nós investigamos se o procedimento de indução de estresse crônico utilizado no presente trabalho pôde diminuir o peso, característica vista em animais estressados (Jeong e col., 2013). Nós comparamos animais intra grupos para verificar se o nado forçado crônico ou a manipulação levaram a mudança de peso ao longo do procedimento, nós também verificamos se havia diferença entre os grupos. A ANOVA de duas vias (Tempo: $F(1, 24) = 0.12$, $p = 0.72$; Tratamento: $F(1, 24) = 0.23$, $p = 0.63$; Interação: $F(1, 24) = 0.03$, $p = 0.85$) foi aplicado comparando o grupo Controle (1º dia $54,78 \pm 1,6$ g e 15º dia $54,46 \pm 2,1$ g) e o grupo FST (1º dia $56 \pm 1,7$ g e 15º dia $55 \pm 1,6$ g). O teste estatístico revelou nenhuma diferença entre ou intra grupos, indicando que o nado forçado crônico não levou ao decréscimo no peso dos animais.

Comportamentos de Ansiedade

A fim de avaliar o comportamento de ansiedade, submetemos os animais ao Labirinto em cruz elevado, no dia 16. Nós usamos o tempo e frequência de entrada nos braços (Carobrez e Bertoglio, 2005) e comportamentos de avaliação de risco (Henriques-Alves e Queiroz, 2015) como métricas para indicar possíveis mudanças nos comportamentos de ansiedade. Nós aplicamos Mann-Whitney para comparar o parâmetro de tempo nos braços abertos entre FST e Controles ($14,13 \pm 7,311$ s e $0,22 \pm 0,22$ s, respectivamente, $U = 10,0$, $p = 0.042$). O teste revelou que o grupo FST passou mais tempo do que o grupo Controle nos braços abertos (Figura 1A). Por outro lado, os animais do grupo FST exibiram menos tempo nos braços fechados do que os controles de acordo com teste t não pareado ($229,5 \pm 13,09$ s e $265,6 \pm 7,90$ s, respectivamente, $t(12) = 2,49$, $p = 0,028$, Figura 1A). Nenhuma diferença entre FST e Controle foi verificada com o teste t quando se compara o tempo gasto no centro ($49,32 \pm 6,45$ s e $31,48 \pm 8,45$ s, respectivamente, $t(12) = 1,579$ $p = 0,14$). Em seguida, comparamos com teste t a frequência de entrada nos braços entre o grupo FST e Controle, o que indicou um maior número de entradas nos braços abertos no grupo FST ($2,00 \pm 0,93$ contra $0,12 \pm 0,12$, respectivamente, $t(12) = 2,32$, $p = 0,039$), nos braços fechados ($11,83 \pm 1,086$ contra $6,5 \pm 1,08$, respectivamente, $t(12) = 2,6$, $p = 0,023$) e no centro ($12,83 \pm 1,55$ contra $1,08 \pm 6,625$, respectivamente, $p = 0,005$, Figura 1B).

A análise dos comportamentos relacionados com a avaliação de risco não revelou nenhuma diferença entre FST e o grupo controle quando comparamos o número total de *flat-back approach* ($21,33 \pm 1,56$ contra $21,88 \pm 3,921$, respectivamente, $U = 21$, $p = 0,74$), *grooming* ($0,83 \pm 0,40$ contra $2,12 \pm 0,64$, respectivamente, $U = 13,5$, $p = 0,18$) e, embora nós podemos ver uma tendência no comportamento *head dipping*, o teste de Mann-Whitney não revelou diferença entre FST e os grupos de controle ($15,00 \pm 4,19$ contra $6,25 \pm 1,90$, respectivamente, $U = 9,0$, $p = 0,059$, Figura 1C).

A atividade locomotora

Finalmente, comparamos a atividade locomotora do grupo FST e do

grupo de Controle. Nós dividimos o aparato do labirinto de cruz elevado em seções de 5 cm quadrados e por contagem do número de travessias no labirinto obtivemos uma medida indireta da atividade locomotora. A comparação do teste t não revelou nenhuma diferença entre os grupos, o teste t não revelou diferenças ($46,13 \pm 7,90$ cruzamentos e 38.14 ± 8.01 cruzamentos, $t(12) = 0,68$ $p = 0,49$).

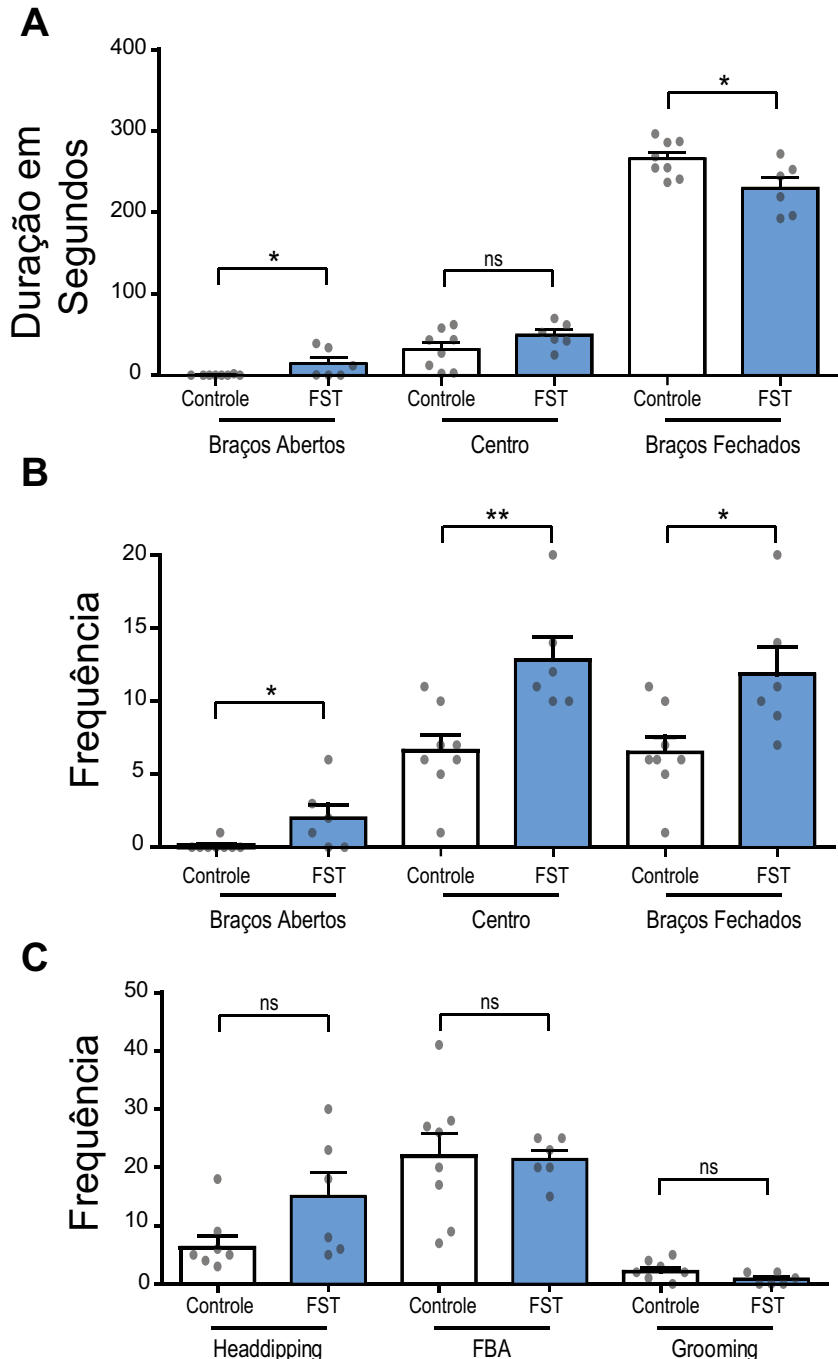


Figura 1. Procedimento de nado forçado crônico diminui comportamentos de ansiedade em camundongos. A: Tempo gasto (duração) em segundos nos braços (abertos e fechados) ou centro de labirinto em cruz. B: Número de entradas nos braços abertos e fechados, ou centro de EPM. C: Frequência de comportamentos relacionados à ansiedade: *head-dipping*, *flat-back approach* (FBA) e *grooming*. Colunas brancas: grupo controle. Azul coluna: Grupo FST. Todas as comparações foram feitas com teste t de Student T ou Mann-Whitney entre estes dois grupos para cada um dos parâmetros (duração ou frequência do comportamento), os dados apresentados com média \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Discussão

A perda de peso é um indicador de estresse em modelos animais de estresse crônico (Jeong e col., 2013; Blanchard e col., 1993). Em animais expostos ao teste de nado forçado não foi encontrada diferença de peso em comparação com os controles. Se os animais tinham desenvolvido o estresse crônico, teríamos provavelmente observado um declínio no peso. Os resultados indicam que o nado forçado não produz grandes sintomas de estresse crônico.

Diversos estudos dão suporte a ideia de que o estresse crônico pode influenciar a regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Chaudieu e col., 2008; Derijk e col., 2008; Kozicz e col., 2008; Sakakibara e col., 2005), o que aumenta a ocorrência de comorbidades, como depressão e ansiedade (Campos e col., 2013; Deng e col., 2015; Jiang e col., 2016; Leuner e Shors, 2013). Surpreendentemente, os nossos resultados sugerem que quinze dias consecutivos de nado forçado não foi capaz de produzir estresse crônico ou sintomas de ansiedade em camundongos.

O labirinto em cruz elevado é um teste padrão para medir respostas de ansiedade (Dawson e Tricklebank, 1995; Kheirbek e col., 2013; Lister, 1987; Pellow e col., 1985). O aumento no número de entradas nos braços está relacionado com um aumento da atividade motora (Cornélio e Nunes-de-Souza, 2007). A atividade locomotora é um parâmetro adicional para avaliar sintomas de estresse, já que estresse crônico produz alterações na locomoção devido à diminuição da exploração do ambiente. Qi e col. (2006), utilizando um modelo de comportamento semelhante (Nado Forçado Crônico) em ratos, observaram uma diminuição na atividade motora, enquanto que os nossos resultados não mostraram esse comportamento, o que não é indicativo de ansiedade ou depressão (Ducottet e Belzung, 2005). Este resultado pode estar relacionado com as espécies animais (camundongos, em vez de ratos) utilizados no presente experimento. Estudos com nado forçado também relataram reações diferentes em relação às espécies animais que são comumente usados nestes modelos (Armario e col., 1995; López-Rubalcava e Lucki, 2000).

No geral, nossos resultados sugerem que o protocolo nado forçado crônico empregado neste estudo foi mais semelhante a uma fonte de exercício crônica leve do que um estressor crônico. O número de entradas nos braços abertos e o tempo gasto nos braços abertos estavam significativamente aumentados em camundongos expostos ao nado forçado crônico. A forte tendência de aumento no número de *head-dipping* em animais FST, em comparação com os Controles, pode indicar que este comportamento de avaliação de risco está relacionada com a diminuição dos níveis de ansiedade (Henriques-Alves e Queiroz, 2015; Porsolt e col., 1977). Este resultado pode reforçar a noção de que o nado forçado crônico em camundongos representa um exercício equilibrado, ao invés de um estímulo de estresse crônico (Pietrelli et al, 2011; Salim e col., 2010).

Vários estudos têm apontado as diferenças entre o exercício equilibrado e exercícios excessivos. O estresse produzido pelo exercício moderado leva a uma diminuição

da ansiedade, enquanto o alto nível de estresse relacionado ao exercício excessivo provoca déficits cognitivos e pode até levar a danos no corpo (Marais e col., 2009; Pietrelli e col., 2011; Salim e col., 2010; van Praag, 2009). Exercícios aeróbicos equilibrados conduzem a uma melhoria das funções cognitivas e uma diminuição da ansiedade (Marais et al, 2009; Salim et al, 2010; van Praag, 2009). Exercícios leves em modelos animais e humanos reduz os danos causados por ansiedade ou estresse, e resulta em benefícios de saúde totais (Salim e col., 2010; van Praag, 2009). A capacidade de flutuação maior em camundongos, em comparação com ratos, pode explicar por que a natação forçada é um estressor mais suave em camundongos.

Conclusão

O presente estudo sugere que camundongos expostos ao nado forçado de forma repetida leva a diminuição da ansiedade devido ao exercício moderado. Isto significa que a utilização de nado forçado como um modelo de ansiedade em camundongos pode exigir um ajustamento do protocolo, estabelecer condições mais estressantes. É sugerido aqui que um aumento no tempo de natação ou a fixação de um peso extra para a cauda do rato pode compensar a flutuação aumentada de camundongos, possivelmente fornecendo o esforço muscular necessário para produzir o estresse crônico e ansiedade nesta tarefa.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Lissandra pela supervisão e contribuições do trabalho. A pesquisa foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Pew Latin-American Program in Biomedical Science, FINEP 01.06.1092.00, INCT-CNPq/MCT INCENMAQ 704134/2009, CNPq Universal 481506/2007-1, and Associação Alberto Santos Dumont para Apoio à Pesquisa (AASDAP).

Chronic exposure to forced swimming decreases anxiety in mice

Arthur S. C. França, Fabíola P. S. Rufino, Bruno Lobão Soares and Sidarta Ribeiro

Introduction

Acute and chronic stress, arising from the social stress (Henriques-Alves and Queiroz, 2015; McEwen, 2012) or behavioral procedures (Badowska-Szalewska et al., 2010; Deng et al., 2015; Linthorst et al., 2002; Sakakibara et al., 2005), have been reported to change several brain biomarkers related to plasticity and limbic transmitters (Badowska-Szalewska et al., 2010; Jiang et al., 2016; Leuner and Shors, 2013; Linthorst et al., 2002) that are also related to anxiety and depression-like behaviors (Campos et al., 2013; Deng et al., 2015; Jiang et al., 2016; Leuner and Shors, 2013). The repeated exposure to acute stress stimuli leads to chronic stress responses in humans and animal models (Qi et al., 2006). In humans, chronic stressors may produce maladaptive responses that led to psychological disorders such as anxiety disorders and major depression (Blanchard et al., 1993; Kozicz et al., 2008). Aiming to simulate stressful conditions in humans, animal models of stress have been tested to produce “allostatic” states comparable to those observed in our species (Qi et al., 2006).

The usage of forced swimming test (FST) to induce stress is broadly used in rats (Badowska-Szalewska et al., 2010; Linthorst et al., 2002; Sakakibara et al., 2005). It has been reported that FST (1) modulates levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF; Badowska-Szalewska et al., 2010); (2) influences serotonin levels (Linthorst et al., 2002; Sakakibara et al., 2005), which is linked to the limbic system; and (3) reduces ERK1/2 levels in the hypothalamus regions (Sakakibara et al., 2005). Although FST is classically used to study depression-like behaviors (Petit-Demouliere et al., 2004; Sakakibara et al., 2005) we also found report of directly evidence of stress induced by FST related to anxiety-like behavior in rats (Habr et al., 2014).

Aiming to investigate if the established link between FST and anxiety-like behavior found in rats also occur in mice, we conducted an experiment submitting mice to chronic FST and by the end of the protocol performed plus-maze in order to evaluate anxiety-like behaviors (Dawson and Tricklebank, 1995; Kheirbek et al., 2013; Lister, 1987; Pellow et al., 1985). Results found in the present work show that animals submitted to chronic FST display increased time spent in open arms of the plus-maze, a behavior that is classically related to decrease of anxiety in rodents. We also found a strong increasing trend of risk evaluation behavior of head-dipping, also related to a decrease of anxiety. Our results suggest that chronic FST does not promote anxiety in mice, but rather leads to an overall decrease of anxiety.

Materials and methods

Animals

Adult Swiss mice (n=16) were kept in a 12-h light-dark cycle (lights on at 06:00 a.m.) and the temperature was kept at 24 ± 1 °C. All animals had access to food and water ad libitum. Housing and behavioral procedures were in accordance with the animal ethical procedures recommended by Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Behavioral Groups

The animals were separated in two groups: (1) the FST group, in which the animals were exposed to the chronic forced swimming procedure, test classically used to induce chronic stress and depression (Petit-Demouliere et al., 2004; Porsolt et al., 1977); and (2) the Control group, in which the animals were exposed only to chronic handling. In the FST group we submitted animals to the FST in individual glass cylinders (20 cm tall, 15 cm in diameter) filled with water (24-27 °C) to a depth of 16 cm. Each mouse (n=6) was individually placed inside a cylinder and therefore forced to swim for 5 min once a day, for 15 consecutive days. Animals in the Control group (n=8) were subjected to 5 min of handling by the experimenter once a day, for 15 consecutive days. All procedures were conducted between 08:00 and 16:00h to avoid behavior difference induced by dark/light period. Mice were weighted on the 1st and 15th day of the experiment, in order to evaluate possible weight loss related to chronic stress and decreased food intake. During the day 16 both groups were submitted to evaluation of anxiety parameters in the elevated plus-maze test.

Elevated Plus-maze

The behavioral task to assess anxiety-like behavior used in the present work was the elevated plus-maze (EPM) (Dawson and Tricklebank, 1995; Kheirbek et al., 2013; Lister, 1987; Pellow et al., 1985), a test based on the natural behavior of rodents to avoid open and/or high places (Pellow et al., 1985). After the 15 days of chronic swimming or chronic handling, animals were submitted, in the day 16, to the plus-maze. The anxiety-related behavioral parameters evaluated in the EPM were (1) frequencies of entry in open arms, closed arms and center; (2) duration of time spent in open arms, closed arms, and center; (3) frequency of head-dipping in open arms (Dawson and Tricklebank, 1995; Kheirbek et al., 2013; Lister,

1987; Pellow et al., 1985) and the risk assessment behaviors related to anxiety in the plus-maze paradigm (Carola et al., 2002; Walf and Frye, 2007): (4) frequency of grooming; (5) frequency of flat-back approaches. We tracked automatically the parameters time spent and the entrance frequency of the arms by using the software AnyMaze (Stoelting Co. USA). The behaviors were blindly scored by a trained observer using the ethological analysis software AnyMaze.

Statistical Analyses

The data were analyzed using Graphpad Prism 5.0. Initially we established that the data were normally distributed and showed homogeneous variances with Shapiro-Wilk normality test. For comparisons between control and FST groups, the data that were normally distributed were compared by the parametric un-paired student's t-test and the data that did not pass normality test were compared by Mann-Whitney. For the comparison of animal weight, we applied multivariate analysis because of the number of independent variables. So, we used the Two-way ANOVA using the time (day 1 and day 15) and treatment (Control and FST groups) as independent variables and the weight measure as the dependent variable. The descriptive statistics provided were the mean \pm SEM, number of animals per group and p value. We considered alpha of 0.05.

During the experimental procedures, two animals fell while exploring the open arms: these animals were withdrawn of the statistical analyses, decreasing the number of FST group from 8 to 6 animals.

Results

Body weight

First we investigated if the chronic stress procedure utilized in the present work could result in similar decrease of weight seen in stressed animals (Jeong et al., 2013). We compared animals within groups to see if the chronic FST or handling would change the weight along the procedure; we also verified if we could see a difference between groups. The Two-way ANOVA (Time: $F(1, 24) = 0.12$, $p = 0.72$; Treatment: $F(1, 24) = 0.23$, $p = 0.63$; Interaction: $F(1, 24) = 0.03$, $p = 0.85$) was then applied comparing Control group (1st day $54,78 \pm 1,6g$ and 15th day $54,46 \pm 2,1g$) and FST group (1st day $56 \pm 1,7 g$ and $55 \pm 1,6g$).

Two-way ANOVA revealed no difference within or between groups, indicating that the chronic FST procedure did not lead to a decrease in animal weight.

Anxiety-like behaviors

In order to evaluate anxiety-like behavior, we submitted the animals to the EPM in the day 16. We used time and frequency of entrance in the arms (Carobrez and

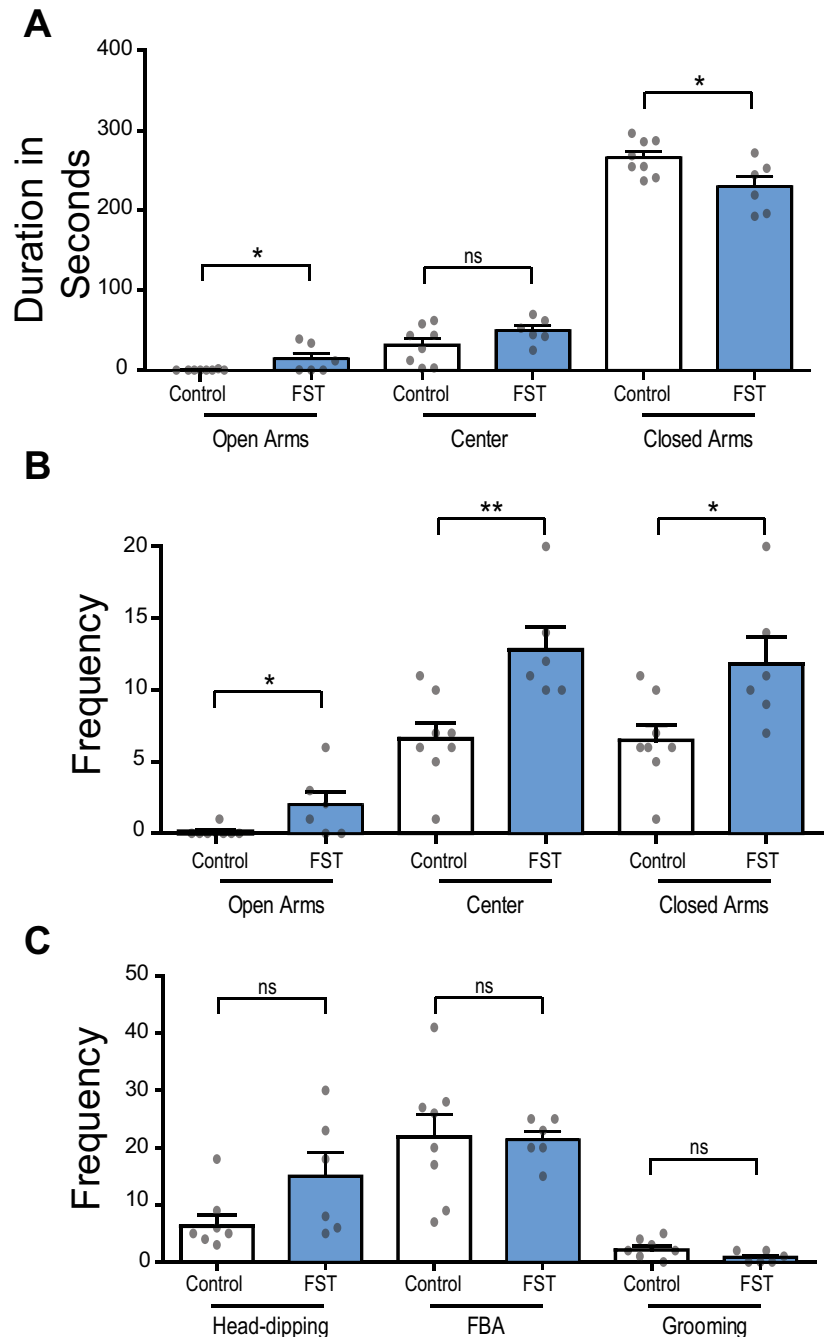


Figure 1. Chronic forced swimming procedure decrease anxiety-like behavior in the Elevated Plus-Maze (EPM) in mice. A: Time spent (duration) in seconds in the arms (open and closed) or center of plus-maze. B: Number of entries in open and closed arms, or center of EPM. C: Frequency of anxiety-related behaviors: Head-dipping, flat-back approach (FBA) and grooming. White columns: Control group. Blue column: FST group. All comparisons used Student's T test or Mann-Whitney between these two groups for each parameter (duration or frequency of behavior), data shown with mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Bertoglio, 2005) and behaviors related to risk assessment (Henriques-Alves and Queiroz, 2015) as metrics to indicate possible changes in anxiety-like behaviors. We applied Mann-Whitney to compare the parameter time in open arms between FST and Controls (14.13 ± 7.311 sec and 0.22 ± 0.22 sec, respectively, $U = 10.0$, $p = 0.042$). The test revealed that the FST group spent significantly more time than the Control group in the open arms (figure 1A). Conversely, animals in the FST group displayed less time in the closed arms than Controls according to unpaired t test (229.5 ± 13.09 sec and 265.6 ± 7.90 sec, respectively, $t(12) = 2.49$, $p = 0.028$ Figure 1A). No difference between FST and Control was verified with t test when we compared the time spent in the center (49.32 ± 6.45 sec and 31.48 ± 8.45 sec, respectively, $t(12) = 1.579$ $p = 0.14$). Accordingly, t test applied comparing the entrance frequency of mice in the FST and control groups also displayed an increased number of entries in open arms (2.00 ± 0.93 , 0.12 ± 0.12 respectively, $t(12) = 2.32$, $p = 0.039$), closed arms (11.83 ± 1.086 versus 6.5 ± 1.08 , respectively, $t(12) = 2.6$, $p = 0.023$) and center (12.83 ± 1.55 versus 6.625 ± 1.08 respectively, $p = 0.005$, Figure 1B).

The analysis of behaviors related to risk assessment revealed no difference between FST and Control groups when we compared the total number of flat back approaches (21.33 ± 1.56 versus 21.88 ± 3.921 respectively, $U = 21$, $p = 0.74$) and grooming (0.83 ± 0.40 versus 2.12 ± 0.64 , respectively, $U = 13.5$, $p = 0.18$). However, we can see a trend in the Head-dipping behavior despite of the Mann-Whitney test did not revealed difference between FST and Control groups (15.00 ± 4.19 versus 6.25 ± 1.90 , respectively, $U = 9.0$, $p = 0.059$, Figure 1C).

Locomotor Activity

Finally, we compared the locomotor activity of the FST group and Control group. For this, we divided the plus-maze apparatus in sections of 5 cm squares and counted the number of crossings in the maze to obtain an indirect measurement of locomotor activity. The t test comparison revealed no difference between groups (46.13 ± 7.90 crossings and 38.14 ± 8.01 crossings, $t(12) = 0.68$ $p = 0.49$).

Discussion

Loss of weight is a stress indicator in animal models of chronic stress (Jeong et al., 2013, Blanchard et al., 1993). In animals exposed to the forced swimming test we found no statistically significant weight difference in comparison with Controls. If the animals had developed chronic stress, we would have probably observed a decline of weight. The results indicate that forced swimming failed to produce major chronic stress symptoms.

Several studies support the idea that chronic stress can influence the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (Chaudieu et al., 2008; Derijk et al., 2008; Kozicz et al., 2008; Sakakibara et al., 2005), which increases the occurrence of comorbidities such as depression and anxiety (Campos et al., 2013; Deng et al., 2015; Jiang et al., 2016; Leuner and Shors, 2013). Surprisingly, con-

trary to what is observed in rats, our results suggest that fifteen consecutive days of forced swimming could not produce chronic stress or anxiety symptoms in mice.

The elevated plus-maze is a standard test for measuring anxiety responses (Dawson and Tricklebank, 1995; Kheirbek et al., 2013; Lister, 1987; Pellow et al., 1985). The increase in the number of general arm entries is related to an enhancement of motor activity (Cornélio and Nunes-de-Souza, 2007). Locomotor activity is an additional variable to evaluate stress symptoms, since chronic stress produces an alteration in locomotion due to decreased exploration of the environment. Qi et al. (2006), using a similar behavioral model (chronic forced swimming) on rats, observed a decrease in motor activity, while our results show no such behavior, and cannot be an indicative of anxiety or depression (Ducottet and Belzung, 2005). This result may be related to the animal species (mice, instead of rats) used in the current experiment. Forced swimming studies have also reported different reactions regarding the animal species that are commonly used in these models (Armario et al., 1995; López-Rubalcava and Lucki, 2000).

Overall, our results suggest that the chronic swimming protocol employed in this study was less a chronic stressor than a source of mild chronic exercise. The number of entries in open arms and the time spent in these arms were significantly increased in mice exposed to chronic swimming. Together, the strong trend of increased Head-dipping numbers in FST animals, in comparison with Controls, may indicate that this risk assessment behavior is related to decrease anxiety levels (Henriques-Alves and Queiroz, 2015; Porsolt et al., 1977). These results can be strengthening the notion that chronic swimming in mice represents mild exercise, instead of a chronic stress stimulus (Pietrelli et al., 2011; Salim et al., 2010).

Several studies have pointed out the differences between balanced and excessive exercise. The stress produced by moderate exercise leads to a decrease of anxiety, while the high stress related to excessive exercise causes cognitive deficits and may even lead to body damage (Marais et al., 2009; Pietrelli et al., 2011; Salim et al., 2010; van Praag, 2009). Balanced aerobic exercise leads to improvement of cognitive functions and a decrease in anxiety (Marais et al., 2009; Salim et al., 2010; van Praag, 2009). Mild exercise in animal models and humans reduces the damage caused by anxiety or stress, and results in overall health benefits (Salim et al., 2010; van Praag, 2009). The greater flotation capability in mice, in comparison with rats, may explain why forced swimming is a milder stressor in mice.

Conclusions

The present study suggests that mice exposed to repeated forced swimming display decreased anxiety due to moderate exercise. This means that the use of forced swimming as an anxiety model in mice may require adjustments of the protocol towards more stressful conditions. We suggest that an increase in swimming time or the attachment of an extra weight to the mouse tail may

compensate the enhanced flotation of mice, possibly providing the muscle effort required to produce chronic stress and anxiety in this task.

Acknowledgements

We want to thank Lissandra for the supervision on the work. The research was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Pew Latin-American Program in Biomedical Science, FINEP 01.06.1092.00, INCT-CNPq/MCT INCENMAQ 704134/2009, CNPq Universal 481506/2007-1, and Associação Alberto Santos Dumont para Apoio à Pesquisa (AASDAP).

References:

- Armario A, Gavaldà A, Martí, J. 1995. Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. *Psychoneuroendocrinology* 20, 879–890.
- Badowska-Szalewska E, Spodnik E, Klejbor I, Morys J. 2010. Effects of chronic forced swim stress on hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor (TrkB) immunoreactive cells in juvenile and aged rats. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 70, 370–381.
- Blanchard DC, Sakai RR, McEwen B, Weiss SM, Blanchard, RJ, 1993. Subordination stress: behavioral, brain, and neuroendocrine correlates. *Behav. Brain Res.* 58, 113–121.
- Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, Guimarães, FS, 2013. Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev. Bras. Psiquiatr.* S101-111
- Carobrez AP, Bertoglio LJ. 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1193–1205.
- Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. 2002. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav. Brain Res.* 134, 49–57.
- Chaudieu I, Beluche I, Norton J, Boulenger JP, Ritchie K, Ancelin ML. 2008. Abnormal reactions to environmental stress in elderly persons with anxiety disorders: evidence from a population study of diurnal cortisol changes. *J. Affect. Disord.* 106, 307–313.
- Cornélio AM, Nunes-de-Souza RL. 2007. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.* 178, 82–89.
- Dawson GR, Tricklebank MD, 1995. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 33–36.
- Deng XY, Li HY, Chen JJ, Li RP, Qui R, Fu Q, Ma SP. 2015. Thymol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in mice. *Behav. Brain Res.* 291, 12–19.
- Derijk RH, van Leeuwen N, Klok MD, Zitman FG. 2008. Corticosteroid receptor-gene variants: modulators of the stress-response and implications for mental health. *Eur. J. Pharmacol.* 585, 492–501.
- Ducottet C, Belzung C. 2005. Correlations between behaviours in the elevated plus-maze and sensitivity to unpredictable subchronic mild stress: evidence from inbred strains of mice. *Behav. Brain Res.* 156, 153–162.
- Habr SE, Macrini DJ, Spinosa H de S, Florio JC, Bernardi, MM. 2014. Repeated forced swim stress has additive effects in anxiety behavior and in catecholamine levels of adult rats exposed to deltamethrin. *Neurotoxicol. Teratol.* 46, 57–61.
- Henriques-Alves AM, Queiroz CM. 2015. Ethological Evaluation of the Effects of Social Defeat Stress in Mice: Beyond the Social Interaction Ratio. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 364.
- Jeong JY, Lee DH, Kang SS. 2013. Effects of Chronic Restraint Stress on Body Weight, Food Intake, and Hypothalamic Gene Expressions in Mice. *Endocrinol. Metab.* 28, 288.
- Jiang YM, Li XJ, Meng ZZ, Liu YY, Zhao HB, Li N, Yan ZY, Ma QY, Zhang HT, Chen JX. 2016. Effects of Xiaoyaosan on Stress-Induced Anxiety-Like Behavior in Rats: Involvement of CRF1 Receptor. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2016, 1238426.
- Kheirbek MA, Drew LJ, Burghardt NS, Costantini DO, Tannenholz L, Ahmari SE, Zeng H, Fenton AA, Hen R. 2013. Differential Control of Learning and Anxiety along the Dorsoventral Axis of the Dentate Gyrus. *Neuron.* 77, 955–968.
- Kozicz T, Bordewin L A P, Czéh B, Fuchs E, Roubos EW. 2008. Chronic psychosocial stress affects corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus and central extended amygdala as well as urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus of the tree shrew. *Psychoneuroendocrinology* 33, 741–754.
- Leuner B, Shors TJ. 2013. Stress, anxiety, and dendritic spines: what are the connections? *Neuroscience* 251, 108–119.
- Linthorst ACE, Peñalva RG, Flachskamm C, Holsboer F, Reul, JMHM, 2002. Forced swim stress activates rat hippocampal serotonergic neurotransmission involving a corticotropin-releasing hormone receptor-dependent mechanism. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2441–2452.
- Lister RG. 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl.)* 92, 180–185.
- López-Rubalcava C, Lucki I, 2000. Strain Differences in the Behavioral Effects of Antidepressant Drugs in the Rat Forced Swimming Test. *Neuropsychopharmacology* 22, 191–199.
- Marais L, Stein DJ, Daniels WMU. 2009. Exercise increases BDNF levels in the striatum and decreases depressive-like behavior in chronically stressed rats. *Metab. Brain Dis.* 24, 587–597.
- McEwen BS, 2012. Brain on stress: how the social environment gets under the skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 Suppl 2, 17180–17185.
- Pietrelli A, López-Costa JJ, Goñi R, López EM, Brusco A, Basso, N. 2011. Effects of moderate and chronic exercise on the nitrenergic system and behavioral parameters in rats. *Brain Res.* 1389, 71–82.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M, 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Thérapie* 229, 327–336.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. 1985. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167.
- Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M. 2004. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl.)* 177, 245–255.
- Qi X, Lin W, Li J, Pan Y, Wang W. 2006. The depressive-like behaviors are correlated with decreased phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in rat brain following chronic forced swim stress. *Behav. Brain Res.* 175, 233–240.
- Sakakibara H, Ishida K, Izawa Y, Minami Y, Saito S, Kawai Y, Butterweck V, Tamaki T, Nakaya Y, Terao J. 2005. Effects of forced swimming stress on rat brain function. *J. Med. Investig. JMI* 52 Suppl, 300–301.

- Salim S, Sarraj N, Taneja M, Saha K, Tejada-Simon MV, Chugh G. 2010. Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. *Behav. Brain Res.* 208, 545–552.
- Van Praag H. 2009. Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci.* 32, 283–290.
- Walf AA, Frye CA. 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* 2, 322–328.

Cães domésticos predadores de ninho de batuíra bicuda (*Charadrius wilsonia*) no nordeste brasileiro

Domestic dogs as nest predators of Wilson's plover (*Charadrius wilsonia*) in northeastern Brazil

Cristovam Guerreiro Diniz^{1*}, Nara Gyzely de Moraes Magalhães², Daniel Guerreiro Diniz², Patrick Douglas Corrêa Pereira¹, Dario Carvalho Paulo², Fabio Renato Rendeiro², David Francis Sherry³ e Cristovam Wanderley Picanço Diniz²

¹Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará, Laboratório de Biologia Molecular e Ambiental, Bragança, Pará, Brasil.

²Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção no Hospital Universitário João de Barros Barreto, Belém, Pará, Brasil.

³University of Western Ontario, Department of Psychology Advanced Facility for Avian Research, London, Ontario, Canada.

*Contato: cristovam.diniz@gmail.com

Resumo. Mesmo a batuíra bicuda (*Charadrius wilsonia*) sendo migratória, uma população residente se reproduz na costa nordeste do Brasil e seu status de conservação é descrito como em declínio pela lista vermelha da IUCN. Cães domésticos, mantidos por pescadores para fazer a guarda do material de pesca, são importantes predadores de ninhos de batuíra bicuda na Ilha do Baiacu (Costa Norte do Brasil). Pescadores locais, entretanto, têm motivação a proteger os ninhos e quando assistiram ao vídeo documentando a predação pelos seus cães agiram rapidamente para removê-los. Percebemos que providenciar evidências sobre as causas da predação dos ninhos pode ser uma estratégia eficaz para a conservação das populações de aves.

Palavras-chave. *Charadrius wilsonia*; Cão doméstico; Predação; Batuíra bicuda.

Recebido: 04mar16

Aceito: 11mai16

Publicado:

05jul2016

Editado por
Davidson Sodré
e revisado por
Camila Domit

Abstract. Although Wilson's plovers (*Charadrius wilsonia*) are migratory, a resident population breeds in coastal northeastern Brazil and their population trend is described as decreasing by the IUCN Red List. Domestic dogs are a major predator of Wilson's plover nests on an island in northeastern Brazil where dogs are kept to guard fishing equipment. Local fishermen, however, are motivated to protect the nests of shorebirds and when shown video recordings documenting nest predation acted quickly to remove dogs. We found that providing local residents with evidence about the causes of nest predation could play an effective role in protecting bird populations.

Keywords. *Charadrius wilsonia*; Domestic dog; Predation; Shorebirds; Wilson's Plover.

Introdução

A batuíra bicuda (*Charadrius wilsonia*) é uma ave migratória costeira que reproduz nas costas do oceano atlântico e pacífico da América do Norte e vem para o Brasil em seu período de invernada (Corbat and Bergstrom, 2000). Ela também reproduz localmente na costa nordeste do Brasil (Rodrigues et al., 1996). Estas aves fazem seus ninhos em áreas entre as dunas com vegetação esparsa e em planícies de areia para diminuir a probabilidade de predação e alagamento (Brown and Brindock, 2011; Dikun, 2008). O estado de conservação descrito para a espécie é de declínio pela lista vermelha da IUCN (BirdLife International 2014).

A primeira sugestão de que a batuíra bicuda estaria se reproduzindo no Brasil foi feita em 1970 (Meyer de Schauensee, 1970). Na última década um declínio dramático vem sendo observado na espécie (Brown and Snyder

III, 2014; Hood and Dinsmore, 2007; Murphy et al., 2005; Ray 2011; Rodrigues 2013). Perturbação antrópica, cachorros selvagens e outros predadores são indicados como fatores que contribuem para o declínio populacional (Beja et al.2014; Brown and Brindock2011; Del Viejo et al. 2004; Lafferty et al.2013) e a consequências ecológicas relacionadas a esse declínio em populações de aves (Şekercioğlu et al.2004).

Nós adicionamos novas informações a essa pressão predatória à batuíra bicuda documentando a predação por cães domésticos (*Canis familiares*) em ilhas utilizadas como ninhais e áreas de invernada na costa norte brasileira. Os pescadores trazem cães para fazer a guarda dos barcos e do equipamento de pesca. Os cães reproduzem nas ilhas e ao passo que o número de cães cresce, cresce também a probabilidade de predação das aves em nidificação.

Métodos

Na Ilha do Baiacu (S 00° 47' 33.0" W 046° 46' 54.9"), usamos vídeo (GoPro HERO 3 Black Edition) e fotografia (Canon 7D, 400mm Tele Objective) para documentar a predação dos ninhos.

Resultados

Em única sessão de observação documentamos a predação de 5 ninhos e um total de 7 ovos em um tempo de 5 minutos por um cachorro doméstico (Figura 1a, com vídeo estendido em <https://www.youtube.com/watch?v=Cbn0TvohlUg>). Junto com ninhos de bатуíra bicuda ninhos de trinta reis (*Sterna antillarum*) também foram predados.

Pescadores da ilha tentam minimizar o impacto que geram no local. Eles marcam os ninhos com pequenas estacas para evitar a destruição de ovos quando andam pela ilha e durante as marés mais altas deslocam os ovos para evitar que sejam levados pela água (Figura 1b, com vídeo estendido em <https://www.youtube.com/watch?v=qlxpeuHken8>). Mostramos nosso vídeo para pescadores que inicialmente não acreditaram que os cães comiam os ovos de aves nidificando e que atribuíam a predação a outros tipos de animais como o caracará

(*Milvago chimachima*). Após assistir o vídeo os pescadores prenderam seus cães e posteriormente transportaram quatro de seis cães existentes na ilha.

Um mês depois voltamos a ilha e não encontramos mais cães, também fotografamos uma bатуíra bicuda recém-nascida (Figura 2). Nossas observações mostraram que cães domésticos são predadores eficientes de ninhos de bатуíra bicuda e outras aves em ilhas ninhais. Nós gravamos um cão destruindo 5 ninhos em alguns minutos. Os pescadores são motivados a proteger os ninhos e em nossa experiência agem rapidamente para diminuir o risco de predação por cães. Baseados nessas observações nós recomendamos fortemente a remoção de cães domésticos de ilhas costeiras da costa norte do Brasil para prevenir a extinção local de aves que nidificam no chão.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo edital de apoio a pesquisa, Programa de Apoio a Núcleos Emergentes PRONEM/FAPESPA/CNPq, pelo Edital Ciências do Mar 2 CAPES Nº 43/2013 e CNPQ/UNIVERSAL nº440722/2014-4.



Figura 1. (a) Ninho de bатуíra bicuda (*Charadrius wilsonia*) predado por cão doméstico. (b) Ninho marcado com estaca contendo indivíduo adulto.



Figura 2. Ninho de bатуíra bicuda (*Charadrius wilsonia*) com filhote. Escala = 5 cm.

Domestic dogs as nest predators of Wilson's plover (*Charadrius wilsonia*) in northeastern Brazil

Cristovam Guerreiro Diniz, Nara Gyzely de Moraes Magalhães, Daniel Guerreiro Diniz, Patrick Douglas Corrêa Pereira, Dario Carvalho Paulo, Fabio Renato Rendeiro, David Francis Sherry and Cristovam Wanderley Picanço Diniz

Introduction

Wilson's plover (*Charadrius wilsonia*) is a western hemisphere migratory shorebird that breeds on the Atlantic and Pacific coasts of North America and winters in Brazil (Corbat and Bergstrom, 2000). It also breeds locally in northeastern Brazil (Rodrigues et al., 1996). Birds nest on interdune areas with sparse vegetation and on sand flats to minimize the risks of predation and flooding (Brown and Brindock, 2011; Dikun, 2008). The population trend of Wilson's plover is described as decreasing by the IUCN Red List of Threatened Species (BirdLife International 2014).

The first suggestion that Wilson's plover reproduces in northern Brazil was made in 1970 (Meyer de Schauensee, 1970). In the last decades a dramatic decline has been observed in this species (Brown and Snyder III, 2014; Hood and Dinsmore, 2007; Murphy et al., 2005; Ray, 2011; Rodrigues, 2013). Human disturbance, feral dogs and other predators are indicated as factors contributing to the population decline (Beja et al. 2014; Brown and Brindock, 2011; Del Viejo et al., 2004; Lafferty et al., 2013) and to related ecological consequences of declines in bird populations (Şekercioğlu et al., 2004).

We add new information about predatory pressure on Wilson's plover by documenting predation by domestic dogs (*Canis familiaris*) on islands used as roosting and nesting sites in the north coastal region of Brazil. Fishermen bring dogs to the islands to guard boats and fishing equipment. The dogs reproduce on the islands, and as their numbers increase, so does the predation risk to nesting shorebirds.

Methods

On Baiacu Island (S 00° 47' 33.0" W 046° 46' 54.9"), we used video (GoPro HERO 3 Black Edition) and still photography (Canon 7D, 400mm Tele Objective) to record nest predation.

Results

In a single observation session, we recorded predation of 5 nests containing a total of 7 eggs in the course of 5 minutes by one domestic dog (Figure 1a and <https://www.youtube.com/watch?v=Cbn0TvohlUg>). Along with nests

of Wilson's plover, nests of the Least tern (*Sterna antillarum*) were also predated.

Fisherman at this site attempt to avoid disruption to nesting birds. They mark known nests with sticks to avoid crushing the eggs when walking on the island and during seasonal high tides move the nests to prevent flooding (Figure 1b and <https://www.youtube.com/watch?v=qlxpeuHken8>). We showed our video recordings to seven fishermen who initially did not believe that the dogs were eating eggs of nesting birds and attributed the predation to other animals, including the yellow-headed caracara (*Milvago chimachima*). When shown the video, the fisherman immediately restrained their dogs and later transported four of six dogs off the island.

A month later we returned to the island and there were no dogs, we also photographed Wilson's plover's nestlings (Figure 2). Our observations show that domestic dogs are highly efficient predators of Wilson's plover nests and the nests of other birds on coastal islands. We recorded a single dog destroying five nests in only a few minutes. Fisherman working on the coastal islands are, however, motivated to protect nests and in our experience acted quickly to reduce the predation risk from dogs. Based on these observations we strongly recommend the removal of domestic dogs from coastal islands of northern Brazil to prevent local extinction of ground nesting birds.

Acknowledgments

This work was supported by Grant N° 083/2014 of Programa de Apoio a Núcleos Emergentes PRONEM/FA-PESPA/CNPq and by Grant N° 43/2013 Ciências do Mar 2 / CAPES.

Referências/References

- Beja P et al. (2014) Predators and livestock reduce bird nest survival in intensive Mediterranean farmland European Journal of Wildlife Research 60:249-258.
- BirdLife International (2014) *Charadrius wilsonia*. The IUCN Red List of Threatened Species.
- Brown AC, Brindock K (2011) Breeding Success and Nest Site Selection by a Caribbean Population of Wilson's Plovers The Wilson Journal of Ornithology 123:814-819 doi:10.1676/10-195.1



Figure 1. (a) Wilson's Plover nestling (*Charadrius wilsonia*) predated by domestic dog. (b) Nests with stick, with an adult.



Figure 2. Wilson's Plover nestling, *Charadrius wilsonia*. Scale = 5 cm.

Brown AC, Snyder III TA (2014) Status of breeding Wilson's Plovers (*Charadrius wilsonia*) on St. Kitts, West Indies *Journal of Caribbean Ornithology* 26:22-25.

Corbat CA, Bergstrom PW (2000) Wilson's Plover (*Charadrius wilsonia*) *The Birds of North America*:16.

Del Viejo AM, Vega X, Gonzalez M, Sanchez J (2004) Disturbance sources, human predation and reproductive success of seabirds in tropical coastal ecosystems of Sinaloa State, Mexico *Bird Conservation International* 14:191-202.

Dikun KA (2008) Nest-site selection of Wilson's Plovers (*Charadrius wilsonia*) in South Carolina. Coastal Carolina University.

Hood SL, Dinsmore SJ (2007) Abundance of Snowy and Wilson's Plovers in the lower Laguna Madre region of Texas *J Field Ornithol* 78:362-368.

Lafferty KD, Rodriguez DA, Chapman A (2013) Temporal and spatial variation in bird and human use of beaches in southern California *SpringerPlus* 2:38 doi:10.1186/2193-1801-2-38.

Meyer de Schauensee R (1970) A guide to the birds of South America Livingston, Wynnewood, Pennsylvania.

Murphy TM, Murphy SR, Griffin D (2005) Colonial nesting seabird guild South Carolina State Documents Depository

Ray KL (2011) Factors affecting Wilson's Plover (*Charadrius wilsonia*) demography and habitat use at Onslow Beach, Marine Corps Base Camp Lejeune, North Carolina. Virginia Polytechnic Institute and State University.

Rodrigues A, Oren D, Lopes A (1996) New data on breeding Wilson's Plovers *Charadrius wilsonia* in *Wader Studie Group Bulletin*.

Rodrigues AAF (2013) Priority areas for conservation of migratory and resident waterbirds on the coast of Brazilian Amazonia *Revista Brasileira de Ornithologia-Brazilian Journal of Ornithology* 15:10.

Şekercioğlu ÇH, Daily GC, Ehrlich PR (2004) Ecosystem consequences of bird declines *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:18042-18047.

Levantamento bibliográfico sobre lontras (*Lontra longicaudis*) com ênfase às populações do Rio Grande do Sul, Brasil

Bibliographical survey of otters (*Lontra longicaudis*) with emphasis on populations of Rio Grande do Sul, Brazil

Márcio Tavares Costa¹ e Ana Paula Tavares Costa²

¹Laboratório de Biologia e Diversidade Animal, Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiana

²Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande

*Contato: marciocosta@unipampa.edu.br

Resumo. A *Lontra longicaudis* é um mamífero da família dos mustelídeos ameaçado de extinção no Rio Grande do Sul. Informações sobre esse animal são importantes na elaboração de futuras medidas conservacionistas. Assim, este trabalho reúne documentos relevantes por meio de uma consulta bibliográfica alusivas às lontras pesquisadas, com ênfase nas populações do estado. Os resultados elucidam parte da biologia, etologia e dispersão das lontras. Nos dados de sua dieta verificamos um hábito oportunista, além de uma possível seletividade para peixes ciclídeos. Concluímos que a espécie ocorre em todo o estado e apresenta preferência por abrigos rochosos e por áreas preservadas. Dados importantes para o amparo da espécie. Contudo, algumas questões ainda necessitam ser respondidas.

Palavras-chave. Carnívoro; Mamífero; Mustelidae; Preservação; Registros.

Recebido: 10ago14

Aceito: 01mar16

Publicado: 05jul16

Editado por Daniel

Lahr e revisado

por Alípio Rezende

Benedetti e revisor

anônimo.

Abstract. *Lontra longicaudis* is a mammal of the mustelid family endangered in Rio Grande do Sul State. Information about this animal is important in development of future conservation action. Thus this work combines relevant documents by means of a bibliographic alluding otters with emphasis on state populations. Results elucidate the biology, ethology and dispersion of otters. Data from diet found an opportunist habit and a possible selectivity about cichlid fish. We conclude that species occurs throughout the state and prefer shelters of rock and preserved areas. Valuable data for support of specie. However, some issues still require to be answered.

Keywords. Carnivorous; Mammal; Mustelidae; Preservation; Records.

Introdução

Lontra longicaudis, conhecida vulgarmente como lontra (Figura 1), é uma espécie de mamífero pertencente à família dos mustelídeos, cuja taxonomia tem sido discutida nos últimos anos, havendo uma tendência na adoção do gênero *Lontra* para grupos de rio do Novo Mundo (Larivière, 1999).

Esse animal pode ser encontrado em toda a América Latina, em ambientes como florestas, matas ciliares, lagos, rios e regiões litorâneas associadas a lagoas costeiras. No Brasil ocorre no bioma Amazônico, Pantanal, Cerrado, Mata Atlântica e Campos Sulinos (Reis et al., 2010). Normalmente, sua presença está vinculada aos predadores de topo de cadeia (Waldemarin, 1999).

Apesar de sua importância como predadoras, as populações de lontras sofrem com os mais variados impactos ambientais. Esses grupos evitam ecossistemas aquáticos degradados e costumam dar preferência por regiões afastadas de distúrbios antrópicos, mas não é raro observá-las em zonas urbanas (Blacher, 1992). No entanto, em virtude do déficit de conhecimentos sobre a biologia, ecologia e comportamento das lontras ocorrentes em ambientes alterados,

avaliar o grau de perturbação tolerado pelas mesmas torna-se difícil.

De acordo com a classificação da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), a *L. longicaudis* está enquadrada como uma espécie que não apresenta dados suficientes – “Data Deficient” (DD). Contudo, o decreto N°

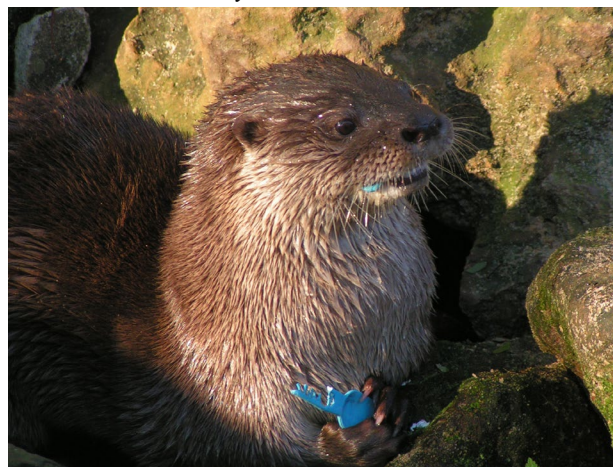


Figura 1. “Lobito de río (*Lontra longicaudis*)” de Carla Antonini (zoológico de Corrientes, Argentina, 2006, cc-by-sa-2.5-ar).

41.672, de junho de 2002, que contém a Lista das Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção no Rio Grande do Sul, aloca a referida espécie como vulnerável. Segundo Machado e colaboradores (2008), a mesma classificação é dada a espécie em questão nos estados do Paraná e Minas Gerais. Assim, com o crescimento de estudos mastozoológicos no Brasil, e em especial no Rio Grande do Sul (RS), o trabalho visa agrupar as informações relevantes originadas de pesquisas abordando *L. longicaudis*, com ênfase nas populações do estado. Além de demonstrar as áreas carentes de dados sobre esses mustelídeos na região, a pesquisa facilita, incentiva e contribui para novos estudos a respeito dessa espécie.

Métodos

O trabalho foi desenvolvido de janeiro a julho de 2013, e baseou-se em um levantamento bibliográfico referente à *L. longicaudis*, com ênfase nas populações do RS, um dos locais onde a espécie é descrita como vulnerável até o momento. Assim, todos os registros encontrados que abordassem as lontras do estado, ou, aqueles considerados como válidos para as mesmas, foram avaliados. Deste modo, o estudo não se limita somente a dados publicados dentro do RS, mas acrescentaram-se as publicações em eventos ou revistas de fora do estado, desde que suas contribuições proporcionem uma projeção para as lontras do extremo sul do Brasil.

Os registros levantados compreendem 23 artigos, 13 livros, três dissertações de mestrado e três resumos presentes em anais de eventos. Totalizando 42 trabalhos avaliados de diferentes fontes, todos liberados para livre consulta na rede mundial de computadores às instituições de ensino superior, exceto alguns dos livros.

As buscas ocorreram por meio das plataformas de Periódicos Capes (www.periodicos.capes.gov.br/), da Livraria Científica Eletrônica Online – SciELO (www.scielo.org) e da Biblioteca Virtual em Saúde (<http://www.bireme.br>), complementada por meio do Google Acadêmico (<https://scholar.google.com.br/>). Utilizando descritores de forma individual ou suas combinações: “Lontra longicaudis”, “Rio Grande do Sul”, “*L. longicaudis*”, lontra.

Cada publicação foi individualmente analisada e suas contribuições comparadas entre si.

Revisão da literatura

Caracterização das lontras brasileiras

Em nosso estudo verificamos aspectos comuns entre as populações do Brasil, como morfologia e ecologia das lontras.

Ao considerar sua morfologia, a *L. longicaudis* é apresentada como um animal de aproximadamente 1,37 m de comprimento, tendo o corpo entre 50 e 80 cm, e a cauda de 36 a 57 cm. Outra característica presente em todos os indivíduos é o corpo alongado com cauda achatada e espessa, bem como a presença de membranas interdigitais para facilitar a natação e duas camadas de pelos bastante densos que garante o isolamento térmico destes animais (Reis et al., 2010). As lontras também contam com órgãos sensoriais na ponta de seu focinho formados por prolongamentos de pelos queratinosos, chamados de vibrissas, os quais auxiliam na localização da presa na coluna d'água (Cimardi, 1996).

Alguns dados ecológicos abrangem a reprodução, a qual ocorre na primavera geralmente. A gestação da espécie se dá em torno de 56 dias e o número de filhotes varia de um a cinco, porém o mais frequente é dois ou três filhotes, que só começam a explorar o ambiente após 52 dias de vida. Com cerca de um ano de idade se dá a separação da mãe, mas a maturidade sexual só é atingida depois de dois anos (Nowak, 1999; Emmons, 1997; Larivière, 1999; Cheida et al., 2006; Quadros, 2009). Registros relatam que lontras podem atingir 23 anos de vida em cativeiro (Reis et al., 2010).

No que tange os hábitos destes animais, aparentemente, não há consenso: segundo Indrussiak e Eizirik (2003), esses indivíduos possuem hábitos diurnos; já Kruuk (1995), Carss e Parkinson (1996), relatam que os mustelídeos são de difícil visualização por serem considerados inconspícuos, principalmente por terem hábitos noturnos e serem extremamente ariscos. Estes últimos acrescentam outra característica comportamental da espécie, as marcas odoríferas: fezes, urina e secreção glandular. Essas marcações estão diretamente relacionadas à advertência, reconhecimento ou atração sexual.

As informações supracitadas trazem explicações comuns às lontras brasileiras, dados como dieta, distribuição e abrigos foram investigados para as populações do RS. Enquanto que os fatores impactantes averiguados possibilitam uma projeção para o estado.

Dieta das lontras no RS

No RS os trabalhos sobre a dieta desenvolvem-se, principalmente, através das análises fecais. Por ser um método não-invasivo obtido facilmente e capaz de fornecer dados de suas presas. Nesta área, as publicações consultadas ilustram o hábito possivelmente oportunista das lontras, contendo uma gama de itens alimentares como aves, crustáceos, insetos, mamíferos, moluscos, répteis e peixes (Figura 2). Com

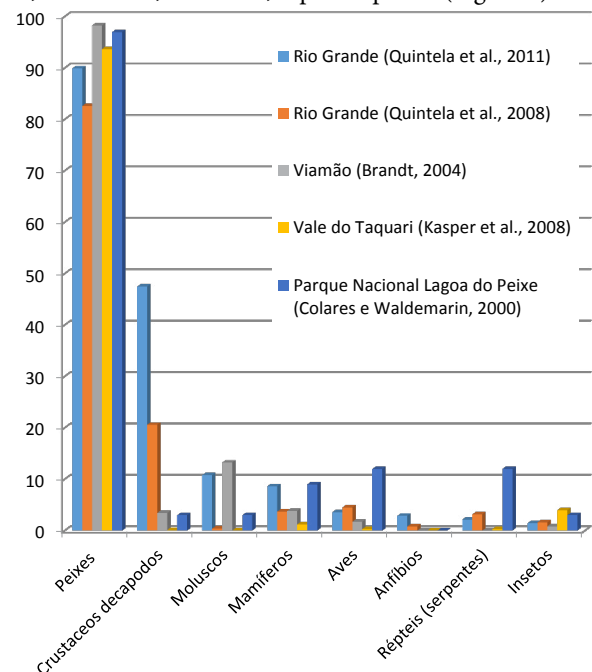


Figura 2. Gráfico comparando a frequência percentual dos itens alimentares de diferentes trabalhos relacionados com a dieta das lontras pela análise fecal no Rio Grande do Sul. A legenda inclui a localidade em que ocorreu o trabalho e suas respectivas referências.

registros de ingestão de espécies invasoras como carpa *Cyprinus carpius* (Kasper et al., 2004a), tilápia *Tilapia rendalli* e truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Perini et al., 2009). Além do molusco bivalve mexilhão dourado *Limnoperma fortunei* (Brandt, 2004). Mamíferos, embora numa frequência menor, é um item alimentar comum. Compreendem alguns registros de presas desta classe o rato do banhado *Myocastor coypus*, a capivara *Hydrochoerus hydrochaeris* (Colares e Waldemarin, 2000), tatu Cingulata: Dasypodidae (Quintela e Gatti, 2009), o gambá *Didelphis albiventris* e o zorrilho *Conepatus chinga* (Quintela et al., 2008). Na classe dos répteis, os resíduos mais encontrados nas fezes são de serpentes, porém, devemos adicionar referências a restos de tartarugas de água doce (Quintela et al., 2011).

Ao tratarmos do consumo de peixes por *L. longicaudis*, seu principal item alimentar, o grupo dos ciclídeos está em evidência na alimentação (Figura 3). Kasper e colaboradores (2004a) propuseram uma estimativa do tamanho das presas utilizadas pelas lontras baseada nas escamas de dois exemplares desse grupo, *Crenicichla punctata* e *Gymnogeophagus labiatus*, encontrada nas fezes da lontra. Constataram que a predação ocorreu principalmente sobre indivíduos de tamanho considerado médio (entre 100 mm e 150 mm). O peso aproximado dos peixes predados foi de 37,6 g para *G. labiatus* e 22,0 g para *C. punctata* nos indivíduos da classe de tamanho citado. Em suma, os autores notaram que houve seletividade na predação em função do tamanho das presas.

Distribuição no estado

A distribuição da espécie no RS deu-se por meio do estabelecimento de um mapa (Figura 4) com base nas ocorrências documentadas por pesquisadores da área (Peters et al., 2013; Barbieri et al., 2012; Quintela et al., 2012, 2011, 2008; Porciúncula e Quintela, 2010; Weber et al., 2009; Santos et al., 2008; Teixeira et al., 2008; Kasper et al., 2008, 2004a, 2004b; Trinca et al., 2007; Bastazini et al., 2005; Waldemarin e Colares, 2000; Quintela e Gatti, 2009; Brandt, 2004; Santos et al., 2004). Neste mapa vemos que

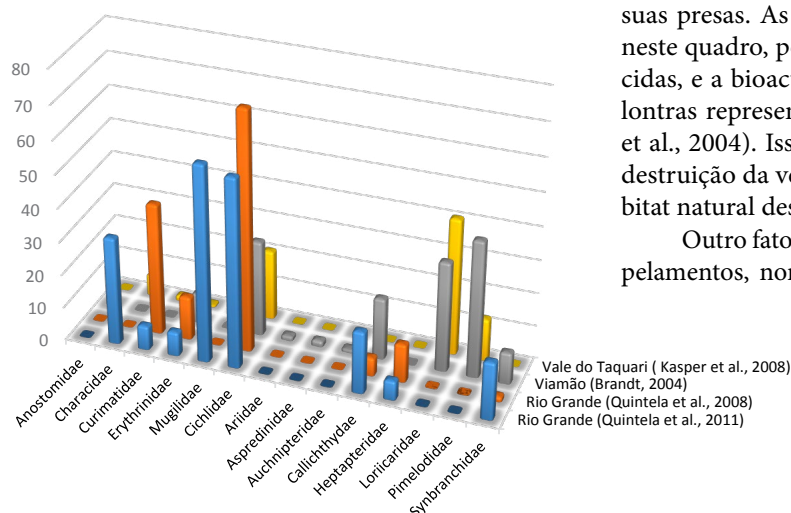


Figura 3. A imagem ilustra as principais famílias de peixes predados por lontras no Rio Grande do Sul de acordo com as casuísticas (em percentual) verificadas pelos autores.

há registros de *L. longicaudis* de leste a oeste do estado. E, quando somado ao modelo de distribuição elaborado por Reis e colaboradores (2010), sugere-se que as lontras estão presentes e amplamente distribuídas em ambos os biomas do estado: Pampa e de Mata Atlântica.

Abrigos

Estes animais são vistos com maior frequência em ambientes com vegetação característica de mata ciliar, com abundância de refúgios. A presença deste tipo de vegetação aumenta a proteção contra intempéries, perturbação humana e de outros animais (Waldemarin e Colares, 2000).

Trabalhos relatam a preferência das lontras gaúchas por tocas rochosas, quando existentes, ou por escavações sob raízes de árvores às margens dos corpos d'água onde vivem (Kasper et al., 2004b). Constatação realizada também na Estação Ecológica do TAIM, onde diversos abrigos artificiais como tubulações são utilizados frequentemente por lontras da região. Além de rochas colocadas na BR 471 para dar sustentação à estrada (Bastazini et al., 2005).

Fatores impactantes

Atualmente, diversas ações antrópicas lesam as populações de lontras no Brasil, entre as principais estão o desmatamento, a construção de hidroelétricas, a agricultura, a exploração de gás e óleo, a caça, a pesca e a intensificação da navegação (Rosas et al., 1991). Algumas destas atividades são problemáticas desde as décadas de 1960 e 1970, como a caça, uma das piores ameaças para a espécie na época devido ao alto valor comercial de sua pele (Broad, 1987).

Na pesca, quando consideradas prejudiciais à atividade, as lontras ainda são eventualmente perseguidas por pescadores (Marques, 2001).

A agricultura, a exploração de gás e óleo, a mineração, entre outras atividades que podem proporcionar a poluição de ambientes aquáticos, irão afetar direta ou indiretamente as populações, prejudicando a saúde e reduzindo o sucesso reprodutivo ou através de danos as suas presas. As culturas de arroz têm ampla relevância neste quadro, pois recebem grandes aplicações de pesticidas, e a bioacumulação em habitats adjacentes ao das lontras representa um risco de envenenamento (Pastor et al., 2004). Isso, somado à drenagem de banhados e a destruição da vegetação nativa, que descaracteriza o habitat natural destes animais (Bastazini et al., 2005).

Outro fator de relevância cada vez maior são os atropelamentos, normalmente ocorrendo próximos a canais associados às estradas (Koenemann e Vieira, 2008).

Todas as consequências geradas por estas atividades potencialmente danosas, consultadas a nível nacional, podem ser projetadas para as populações do RS quando as mesmas forem realizadas sem a devida precaução.

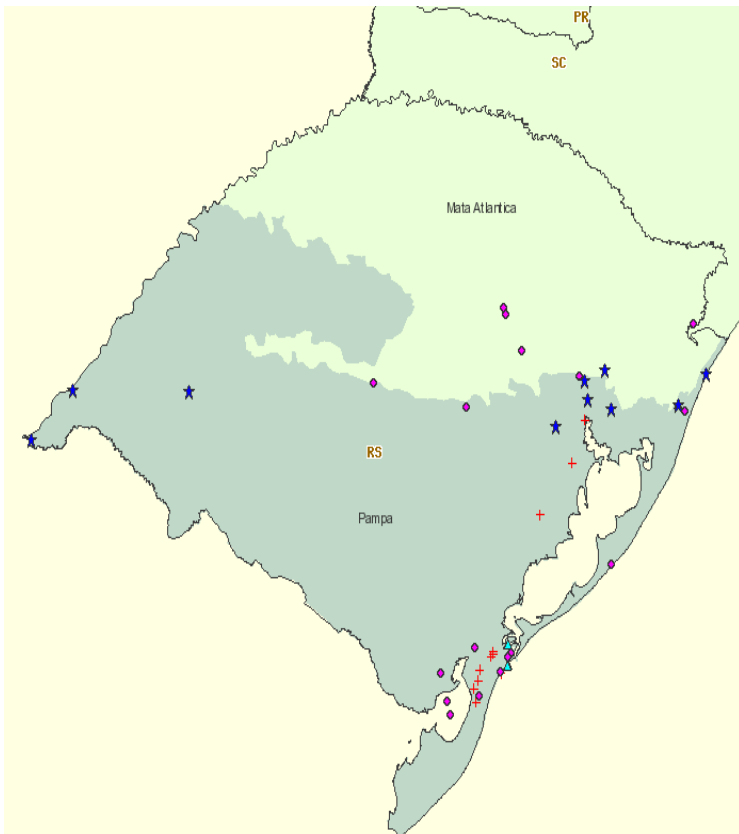


Figura 4. Pontos de ocorrência da *Lontra longicaudis* no estado do RS. São registros de atropelamentos (cruzes) e de caça (triângulos). Somado a registros de presença através de fotografias, fezes, muco anal ou visual com base em coordenadas (círculos) ou na localidade citada na publicação (estrelas).

Resultados e Discussão

A revisão literária revela características comuns à espécie das lontras brasileiras. Até o término deste levantamento, pesquisas voltadas à reprodução e biometria especificamente dos animais do extremo sul não foram encontrados.

No que se refere à posição antagônica de Indrussiak e Eizirik (2003); e Kruuk (1995), Carss e Parkinson (1996) em relação aos hábitos da *L. longicaudis*, por experiência pessoal, notamos que não é raro deparar-se com este mustelídeo durante o dia na cidade de Rio Grande/RS, nos locais onde ele ocorre. Entretanto, isto não anula possíveis hábitos noturnos do mesmo.

Na dieta, não houve surpresas quanto ao item alimentar de maior significância para as lontras: peixes. Mas os trabalhos ilustram uma maior ocorrência de peixes da família Cichlidae na alimentação. Kasper e colaboradores (2004a) complementam sugerindo a presença de seletividade na escolha dos peixes de acordo com o tamanho destas presas. Teses que ainda devem ser confirmadas, pois observações realizadas por Perini et al. (2009) mostram que as escamas de ciclídeos são extremamente resistentes à digestão e são facilmente identificadas. Fato que pode ter contribuído para uma possível superestimação desta família na dieta da *L. longicaudis* em estudos de campo. Outros itens alimentares que também podem estar superestimados são moluscos e insetos, pois os mesmos poderiam estar presentes no trato intestinal de peixes no momento em que esse foi ingerido pela lontra.

Sua distribuição não deixa dúvidas que a *L. longicaudis* ocorre em todo o RS. No entanto, acreditamos que a maior incidência no lado leste do estado se deva ao maior número de estudos na região. Onde estão localizadas universidades como a FURG, UFPEL e UFRGS.

Os registros levantados sobre os locais utilizados preferencialmente pelas lontras destacam a importância da preservação das matas ciliares. Sua preferência por abrigos rochosos aponta para um padrão específico, pois paralelamente Pardini e Trajano (1999) descreveram esta característica para populações do estado de São Paulo. Tais avaliações foram realizadas com base na reincidência dos animais ao mesmo local. E, possivelmente, os resguardos rochosos estão em destaque devido à baixa erosão sofrida por estes abrigos com o fluxo de cheia e vazante dos ecossistemas aquáticos habitados.

Ainda que apresente preferências por determinados abrigos, a flexibilidade das lontras foi registrada por Santos e colaboradores (2007) por meio de um filhote que ocupava uma cavidade na copa de uma árvore em uma floresta inundada na Amazônia Central, no pico de cheia do ciclo anual de inundações.

Ecologicamente, a *L. longicaudis* está associada a predadores de topo de cadeia, tornando-a de considerável importância, pois será responsável pelo controle populacional de suas presas, além de agir como uma espécie indicadora de qualidade do ambiente.

No entanto, ações antrópicas afetam direta ou indiretamente seu tamanho populacional, mas ainda não se têm estudos conclusivos sobre seu estado de conservação. McDonald (1990) relata a presença de lontras habitando ambientes alterados, entretanto o grau de tolerância em relação à degradação por parte das populações não está documentado.

Questão importante, pois de acordo com Galetti e colaboradores (2008), testes de homogeneidade genética, identidade genética e de divisão populacional revelaram diferenças genéticas significativas entre determinados pontos de ocorrência, mostrando que há divisão populacional mesmo no extremo sul do Brasil. Fato que pode dificultar futuras medidas conservacionistas.

Conclusão

Ao observar o trabalho podemos identificar dados bem consolidados para a espécie, como os padrões comportamentais – marcações odoríferas; padrões alimentares – peixes como principal item alimentar e a possível seletividade por ciclídeos de tamanhos medianos; bem como a preferência por abrigos rochosos.

Uma ferramenta nas estratégias de conservação são os mapas de distribuição da espécie abordada - uma contribuição deste trabalho para lontras do RS. Bem como o levantamento dos principais impactos sofridos por lontras.

Contudo, ainda restam dúvidas sobre este mustelídeo. Uma indagação enfatizada é quanto ao aspecto reprodutivo, porque não há comparações entre populações do extremo sul e populações localizadas mais ao norte do país. Investigações sobre o comportamento da *L. longicaudis* também são necessárias, a fim de esclarecer seus hábitos. Assim como estudos que tragam a tolerância destes animais às perturbações nos ecossistemas onde ocorrem.

Enfim, esta revisão sobre *L. longicaudis* foi uma maneira de compilar dados, muitas vezes carentes, outras diversos, de diferentes autores. Dados biológicos da espécie são importantes para a conservação da mesma e ilustra as necessidades dessas populações para manterem-se em equilíbrio. Ao considerar que essa espécie é dita por muitos autores como carismática, há a possibilidade também do uso de sua imagem para buscar a consciência ambiental.

Referências

- Barbieri F, Machado R, Zappes CA, Oliveira LR. 2012. Interactions between the neotropical otter (*Lontra longicaudis*) and gillnet fishery in the southern Brazilian coast. *Ocean & Coastal Management* (63): 16-23.
- Blacher C. 1992. A Lontra: Aspectos de sua biologia, ecologia e conservação. Florianópolis: Ibama - UFSC.
- Bastazini VAG, Sousa KS, Mazin FD, Soares JBG. 2005. Uso de áreas antrópicas por lontras, *Lontra longicaudis* (Olfers, 1818) (Carnivora: Mustelidae), na região litorânea meridional do Rio Grande do Sul. In: XIV Congresso de Iniciação Científica da UFPEL, Pelotas, 2005. Anais... Pelotas: UFPEL, 2005. Disponível em: < http://www.ufpel.edu.br/cic/2005/arquivos/CB_00571.rtf >. Acesso em: 08 de set de 2013.
- Brandt AP. 2004. Dieta e Uso do Habitat por *Lontra longicaudis* (Carnivora: Mustelidae), no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, RS. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ecologia.
- Broad S. 1987. The harvest of and trade in Latin American spotted cats (Felidae) and otters (Lutrinae). Wildlife Trade Monitoring Unit, Cambridge, 1987. *Apud*: Foster - Turley P, McDonald S, Mason. Otters: An Action Plan for their Conservation. IUCN Otter Specialist Group, p. 14.
- Carss DN, Parkinson SG. 1996. Errors associated with other *Lutra lutra* faecal analysis. I. Assessing general diet from spraints. *Journal of Zoology*, 238: 319-332.
- Cimardi AV. 1996. Mamíferos de Santa Catarina. 1 ed. Florianópolis: FATMA.
- Cheida CC, Nakano-Oliveira E, Fusco-Costa R, Rocha-Mendes F, Quadros J. 2006. Ordem Carnívora. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima I, editores. Mamíferos do Brasil. Londrina: UEL p 231-275.
- Colares EP, Waldermarin HF. 2000. Feeding of the neotropical river otter (*Lontra longicaudis*) in the coastal region of the Rio Grande do Sul State, Southern Brazil. *IUCN Otter Spec. Group Bull* 17 (1): 6 – 13.
- Emmons L. 1997. Neotropical Rainforest Mammals. Chicago: University of Chicago Press.
- Galetti Jr PM, Rodrigues FP, Solé-Cava A, Miyaki CY, Carvalho D, Eizirik E, Veasey EA, Santos FR, Farias IP, Vianna JA, Oliveira LR, Weber LI, Almeida-Toledo LF, Francisco MR, Redondo RAF, Siciliano S, Del Lama SN, Freitas TRO, Hrbek T, Molina WF. 2008. Genética da conservação brasileira. In: Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA, editores. Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto: SBG p244-274.
- Indrussiak C, Eizirik E. 2003. Carnívoros. In: Fontana CS, Becke GA, Reis RE, editores. Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: EDIPUCRS p 507 – 553.
- Kasper CB, Salvi J, Grillo HCZ. 2004. Estimativa do tamanho de duas espécies de ciclídeos (*Osteichthyes, Perciformes*) predados por *Lontra longicaudis* (Olfers) (Carnivora, Mustelidae), através de análises das escamas. *Revista Brasileira de Zoologia* 21(3): 499-503.
- Kasper CB, Feldens MJ, Salvi J, Grillo HCZ. 2004. Estudo preliminar sobre a ecologia de *Lontra longicaudis* [Olfers] (Carnivora, Mustelidae) no Vale do Taquari, sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21(1): 65-72.
- Kasper CB, Bastazini VAG, Salvi J, Grillo HCZ. 2008. Trophic ecology and the use of shelters and latrines by the Neotropical otter (*Lontra longicaudis*) in the Taquari Valley, Southern Brazil. *Iheringia, Sér. Zool.*, Porto Alegre, 98(4):469-474.
- Koenemann JG, Vieira EM. 2008. O Atropelamento da fauna silvestre nas estradas brasileiras In: VIII Salão de Iniciação Científica e VIII Mostra Científica da PUCRS, Uruguaiana. Anais... Uruguaiana: PUCRS.
- Kruuk H. 1995. Wild Otters: Predation and population. Oxford: Oxford University Press.
- Larivière S. 1999. *Lontra longicaudis*. *Mammals Species* 609: 1 – 5.
- Machado ABM, Drummond M, Paglia AP. 2008. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. 1.ed. Brasília: MMA, Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas.
- Marques JG. 2001. Pescando Pescadores. 2º. ed. São Paulo: NUPAUB.
- McDonald SM. 1990. Surveys. *Apud*: Foster-Turley P, McDonald S, Mason C, editores. Otters: An Action Plan for their Conservation. IUCN Otter Specialist Group. 126 p.
- Nowak RM. 1999. *Walker's Mammals of the World*. v. 1. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press.
- Pardini R, Trajano E. 1999. Use of shelters by the neotropical river otter (*Lontra longicaudis*) in atlantic forest stream, southeastern Brazil. *Journal of Mammalogy*, Lawrence 80(2): 600-610.
- Pastor D, Sanpera C, González-Solis J, Ruiz X, Albaigés J. 2004. Factors affecting the organochlorine pollutant load in biota of a rice field ecosystem (Ebro Delta, NE Spain). *Chemosphere* 55(4): 567-576.
- Perini AA, Vieira EM, Schulz UH. 2009. Evaluation of Methods used for diet analysis of the neotropical otter *Lontra longicaudis* (Carnivora: Mustelidae) based on spraints. *Mammalian Biology* 74(3): 230 – 235.
- Peters FB, Coelho EL, Vasconcelos BCE, Roth PRO, Christoff AU. 2013. Dental anomalies in *Lontra longicaudis* (Carnivora: Mustelidae) collected in Southern Brazil. *IUCN Otter Spec. Group Bull.* 30(1).
- Porciuncula RA, Quintela FM. 2010 A record of invasive black catfish (*Trachelyopterus lucenai*) predation by the neotropical river otter (*Lontra longicaudis*) in restinga of Rio Grande, Southern Brazil. *IUCN Otter Spec. Group Bull.* 27(1).
- Quadros J. 2009. Plano de conservação para lontra neotropical (*Lontra longicaudis*). p. 137-150. In: Plano de conservação para espécies de mamíferos ameaçados. Instituto Ambiental Paraná (IAP) / Projeto Paraná Biodiversidade.
- Quintela FM, Da Silva FA, Assis CL, Antunes VC. 2012. Data on *Lontra longicaudis* (CARNIVORA: MUSTELIDAE) mortality in southeast and Southern Brazil. *IUNC Otter Spec. Group Bull.* 29(1).
- Quintela FM, Gatti A. 2009. Armadillo (Cingulata: Dasypodidae)

- in the diet of the neotropical otter *Lontra longicaudis* in southern Brazil, Rio Grande, RS. IUNC Otter Spec. Group Bull. 26(2).
- Quintela FM, Porciuncula RA, Da Silva FA. 2011. Diet of *Lontra longicaudis* (OLFERS, 1818) (CARNIVORA: MUSTELIDAE) in three limnic systems in southern state, Brazil. In: X Congresso Brasileiro de Ecologia do Brasil, São Lourenço – MG.
- Quintela FM, Porciuncula RA, Colares EP. 2008. Diet of *Lontra longicaudis* (Olfers) in a coastal stream in southern Rio Grande do Sul State, Brazil. Neotropical Biology and Conservation 3(3) p 119-125.
- Reis R, Peracchi AL, Fregonezi MN, Rossaneis BK. 2010. Mamíferos do Brasil - Guia de identificação. 1ed. Rio de Janeiro: Technical Books.
- Rosas FCW, Colares EP, Colares IG, Silva VMF. 1991. Mamíferos aquáticos da Amazônia brasileira. 1991. 405-411. In: Val AL, Figliuolo R, Feldsberg E. 1991. Bases Científicas para o Estabelecimento de Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia: Fatos e Perspectivas. vol.1. 440 p.
- Santos MFM, Pellanda M, Tomazzoni AC, Hasenack H, Hartz SM. 2004. Mamíferos carnívoros e sua relação com a diversidade de habitats no Parque Nacional dos Aparados da Serra, sul do Brasil. Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre, 94(3):235-245.
- Santos PMRS, Kinupp VF, Coletto-Silva A. 2007. Abrigo em copa de árvore de filhote de lontra Neotropical (*Lontra longicaudis* - Carnivora: Mustelidae) em floresta inundável amazônica. Acta Amazônica 37(2): 309 – 312.
- Santos TG, Spies MR, Kopp K, Trevisan R, Cechin SZ. 2008. Mammals of the campus of the Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. Biota Neotrop. 8(1).
- Teixeira MB, Dornelles RC, Ávila M, Kerber L, Koenemann JG. 2008. Registro de ocorrência de *Lontra longicaudis* (Olfers, 1818) no sudoeste do Rio Grande do Sul, Brasil. Revista Biodiversidade Pampeana 6(2): 74-78.
- Trinca CS, Waldemarin HF, Eizirik, E. 2007. Genetic diversity of the Neotropical otter (*Lontra longicaudis* Olfers, 1818) in Southern and Southeastern Brazil. Braz. J. Biol., 67(4, Suppl.): 813-818.
- Waldemarin HF. 1999. Análise da Contaminação da lontra (*Lontra longicaudis*) por metais pesados em uma Unidade de Conservação e uma área com forte influência antrópica. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ecologia.
- Waldemarin HF, Colares EP. 2000. Utilisation of resting sites and dens by the neotropical river otter (*Lontra longicaudis*) in the south of Rio Grande do Sul state, southern Brazil. IUCN Otter Specialist Group Bulletin 17(1): 14-19.
- Weber LI, Hildebrand CG, Ferreira A, Pedarassi G, Levy JA, Colares EP. 2009. Microsatellite genotyping from faeces of *Lontra longicaudis* from southern Brazil. Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre, 99(1):5-11.