



Universidade Federal do Amazonas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Departamento de Apoio à Pesquisa
Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica



Sexagem hormonal, visual e histológica em tracajá (*Podocnemis unifilis*
Troschel 1848).

Bolsista: Tayanne da Silva Lopes, CNPq.

Manaus
2016



Universidade Federal do Amazonas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Departamento de Apoio à Pesquisa
Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica



RELATÓRIO FINAL
PIBIC: PIB-B/0070/2015-2016

Sexagem hormonal, visual e histológica em tracajá (*Podocnemis unifilis*
Troschel 1848).

Bolsista: Tayanne da Silva Lopes

Orientador: Prof. Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan

Co-Orientador: Paulo César Machado Andrade

Manaus
2016

RESUMO

A identificação do sexo em tartarugas é feita pela análise morfológica das gônadas. O exame é feito de forma visual utilizando um estereomicroscópio ou histológico por meio da análise microscópica. A sexagem visual requer experiência do observador, no entanto, diversas falhas ocorrem devido às semelhanças anatômicas entre as gônadas, as quais dependem do grau de maturação. Baseado nisso, 66 exemplares de filhotes de tracajá, *Podocnemis unifilis* (Testudines: Podocnemididae) provenientes do município de Terra Santa (Estado do Pará) e Oriximiná (Estado do Amazonas) foram sexados por dois examinadores diferentes (um mais experiente, LFM-1; e outro de menor experiência, LMF-2). No geral, a correspondência entre os dois observadores é positiva. Mas o grau de acerto é baixo, apenas cerca de 62% de congruência no geral. As discordâncias são maiores nos machos (54,3%) que nas fêmeas (43,2%). Provavelmente, as finas e delicadas estruturas gonadais do tracajá dificulta a sexagem. Ainda que se adote os critérios estabelecidos para tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*), o grau de acerto para tracajá é menor que na tartaruga. Os erros foram normalmente cometidos devido às semelhanças entre as estruturas das gônadas. Essas inconsistências serão resolvidas na segunda fase do projeto, após a sexagem histológica que é conclusiva.

Palavras chave: Podocnemididae, sexagem visual, anatomia gonadal, tartarugas aquáticas, testículos, ovários.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Métodos de identificação sexual em filhotes e juvenis

Em diversos répteis, incluindo em tartarugas, a determinação sexual é dependente da temperatura de incubação (TSD) descrita pela primeira vez em lagartos em 1966 (Wilbbels, 2003), desde então esta descoberta tornou-se um consenso. Em relação às tartarugas, uma determinada faixa de temperatura, onde mais baixas, produz um maior número de machos enquanto que outra, temperaturas maiores, tendem a produzir mais fêmeas, existindo ainda um intervalo de transição onde são gerados ambos os sexos (Owens, 1997).

Como posto que o sexo é dependente da temperatura, a definição da proporção sexual torna-se particularmente significativo a esta espécie. A temperatura do globo vem aumentando nos últimos anos e, com isso, pode produzir um impacto sobre as populações de quelônios, fazendo com que seja necessária a manipulação do homem para evitar a produção de apenas um sexo (Mrosovsky, 1994). A sexagem em indivíduos adultos na maioria das espécies de tartarugas pode ser realizada por meio da morfologia externa a partir do formato do plastrão e altura da cauda dos animais (Pritchard; Trebbau, 1984; Molina; Rocha, 1996), no entanto em indivíduos imaturos isto não é possível (Owens et al., 1978), embora que para modelar uma população é necessário conhecer a razão sexual, uma vez que podem afetar a taxa reprodutiva futura da população (Delgado, 2010).

Em razão dos filhotes de tartarugas, na maioria das espécies, não possuem características externas que possam ser utilizadas para a diferenciação sexual, levando então à necessidade de realizar a identificação sexual através de outros métodos, algumas técnicas foram desenvolvidas (Larios, 1999), entretanto uma das grandes dificuldades na identificação sexual dos filhotes é a complexidade dos métodos usados na sexagem (Wibbels, 2003). Portanto, dada a ausência de características sexuais morfológicas externa e confiáveis para identificação do sexo em tartarugas, 4 metodologias são atualmente mais usadas para sexagem:

a) a visualização direta da gônada, no caso de animais mortos incluindo recém-eclodidos e juvenis, de preferência com validação histológica (Mrosovsky & Benabib, 1990; Malvásio, 2002).

b) a visualização direta da gônada através de laparoscopia de animais vivos, no caso de juvenis e sub-adultos (Limpus, 1985; Wibbels, 1999).

c) indiretamente determinando valores hormonais, que se correlacionam com o sexo (Xia, 2011; Owens, 1997).

d) Histologicamente, que é considerada a mais segura (Malvásio, 2012).

Enquanto a visualização direta da gônada, seja em animais mortos ou sob a laparoscopia, baseia-se em a diferenciação macroscópico e/ou microscópico das gônadas em testículos ou ovários, a sexagem hormonal baseia-se no fato de que os machos têm níveis mais elevados de testosterona do que fêmeas. Técnicas cirúrgicas invasivas como a laparoscopia devem ser evitadas, apesar de ser um método confiável, existem dificuldades em se realizar o mesmo a campo, pois além de consumir grande período de tempo, é extremamente invasivo e requer treinamento cirúrgico prévio (Wibbels et al., 1987; Witzell et al., 2005) o que é logisticamente difícil para amostras grandes (Owens, 1997). Existem também os limites físicos para o procedimento, estes incluem: (1) As tartarugas devem ser grandes o suficiente para acomodar o laparoscópio 2,7 milímetros e (2) deve haver espaço suficiente entre o laparoscópio e a gônada de modo que as características possam ser observadas, ou seja, em tartarugas recém-eclodidas o vitelo deve ser absorvido totalmente para não evitar o alcance (Wyneken, 2007).

Quanto à visualização das gônadas, esta pode produzir resultados duvidosos, pois existem espécies onde as gônadas não apresentam diferenciação nítida entre machos e fêmeas, devendo ser utilizado a avaliação histológica das gônadas para a confirmação em casos duvidosos devido à técnica ser segura e eficaz (Godfrey; Barreto; Mrosovsky, 1997; Wibbels, 2003).

Embora os sistemas genitais sejam diferentes entre machos e fêmeas, um sexo frequentemente possui rudimentos das estruturas características do outro. Durante a identificação do sexo estes indivíduos são considerados intersexos. O termo refere-se a um indivíduo de qualquer espécie que exibe ambas as características de sexo masculino e feminino (Limpus et al., 1982). Isto acontece devido ao fato de que durante algum

tempo durante a vida embrionária ocorra um estágio que a gônada se apresenta bipotencial, com características de ambos os sexos. As gônadas podem atingir tamanhos consideráveis sem mostrar características específicas de ovários ou testículos, podendo ser facilmente confundida, apresentando um grau considerável de potenciais membros de ambos os sexos (Delgado, 2010). No entanto, não parece um cenário sexual definitivo, posteriormente as gônadas se tornam especificamente testículos ou ovários, e somente estruturas acessórias adequadas para um sexo ou outro continuam o seu desenvolvimento. As estruturas não pertinentes, característicos do sexo oposto, geralmente cessam o desenvolvimento e pode ser reabsorvidas (Merchant – Larios, 1989).

Vogt (1994) afirma que a histologia é uma técnica bastante adequada para a identificação sexual dos filhotes de tartarugas, entretanto, esta técnica só deve ser usada em casos de dúvida, pois é trabalhosa e requer a morte dos animais. Estudos em *Caretta caretta* sobre a análise da morfologia externa das gônadas, com posterior estudo histológico, concluíram que o exame macroscópico das gônadas não é suficiente para identificar o sexo dos filhotes recém-eclodidos, sendo necessária uma avaliação histológica (Yntema, 1981). No entanto, Souza e Vogt (1994) obtiveram para *Podocnemis unifilis* um nível de concordância de 80%. Em filhotes de Tartarugas, ainda há controvérsias a despeito da metodologia mais eficiente para sexagem.

Levando em conta os problemas descritos, a dosagem hormonal de estradiol, testosterona e progesterona, surge como um método alternativo menos invasivo, a análise dos níveis de hormônios tem sido sugerida como um procedimento alternativo, que pode ser realizado através de Radioimunoensaio (RIA) que é preciso, confiável e consiste na coleta de sangue (Wibbels *et al.*, 1987; Owens *et al.*, 1978), porém é caro e de difícil acesso. Todavia, a fim de caracterizar melhor o dimorfismo entre os sexos a análise também pode ser realizada pelo Enzyme Linked Immuno Sorben Assay (ELISA) que possui as mesmas características e o custo é menor. Neste estudo, foi utilizada uma avaliação combinada dos níveis hormonais, métodos visuais e histológicos para sexagem de filhotes de *Podocnemis unifilis*.

1.2 A espécie *Podocnemis unifilis*

Podocnemis unifilis é uma espécie pertencente ao gênero *Podocnemis* pertencente a família *Podocnemididae* de cágados, ou tartarugas de água doce, comum em rios da América do Sul. A tartaruga *Podocnemis unifilis*, é conhecido popularmente no Brasil como tracajá, é considerada uma importante fonte de ovos e carne e constitui uma atividade econômica para os ribeirinhos que as usam como proteína de alto valor em suas dietas (Fachín, et al., 1997). Dentre as espécies do gênero, *P. unifilis* é a segunda espécie em proporções de tamanho, sendo menor somente que a tartaruga gigante da Amazônia (*P. expansa*). A espécie possui carapaça achatada dorsoventralmente, de coloração marrom ou verde oliva, que não ultrapassa 70 cm de comprimento (IBAMA, 1989). O dimorfismo sexual é evidente em animais adultos, sendo os machos de menor tamanho e cauda maior e as fêmeas de maior tamanho e com cauda menor, entretanto recém-eclodidos e juvenis não apresentam características sexuais externas (Salera-Junior e Malvasio, 2005). A maturidade sexual supõe-se que ocorra por volta dos sete anos (Valenzuela, et al., 2004).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral do projeto

Identificação sexual por meio da análise hormonal, histológica e visual das gônadas de filhotes recém-eclodidos de tracajás, *P. unifilis*.

2.2 Objetivos específicos do projeto

Principais análises são para:

- Análise dos seguintes hormônios: testosterona, progesterona, estradiol em filhotes de Tracajás, *P. unifilis*.
- Sexagem através da histologia de gônadas de filhotes recém-eclodidos de tracajás, *P. unifilis*.
- Identificação do sexo pela visualização de características morfológicas das gônadas de filhotes de tracajás, *P. unifilis*.

-Relacionar os dados hormonais, visuais e morfométricos das gônadas dos filhotes de tracajá.

3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 Animais

Foram utilizados 47 animais da espécie *Podocnemis unifilis* (Figura1) que foram abatidos e cedidos pelo Projeto Pé-de-pincha (<http://pedepincha.com.br>). Foram oriundos do município de Oriximiná/Pa (01° 45' 36" S/55° 51' 45" O) e do tabuleiro de Aliança, no município de Terra Santa/Pa (02° 06' 15" S/56° 29' 13" W) (Figura 2). Adicionalmente mais 6 indivíduos de Terra Santa/Pa, do mesmo período de desova, porém de um ano anterior (2014).

Os tracajás pesavam $10,6 \pm 2,1$ g, comprimento da carapaça de $38,7 \pm 2,7$ mm, comprimento do plastrão de $36,10 \pm 2,56$ mm. Os exemplares de tracajás foram filhotes recém-eclodidos com tempo de vida em até dez dias de vida. Os animais foram mantidos por uma semana no Laboratório de Morfologia Funcional/ICB em temperatura ambiente. Após as biometrias, os tracajás foram abatidos. Antes do abate, os animais foram submetidos à hipotermia. A baixa temperatura induz o animal a um estado de torpor e evita procedimento desumano para o abate. Imediatamente após o abate, o sangue foi retirado e mantido em gelo. Após isso, os animais foram fixados em glutaraldeído tamponado (GTA 2,5 %) e/ou formalina tamponada (10%) durante 24 horas. Após essa etapa foram pós-fixados em etanol 70% para posterior sexagem em estereomicroscópio. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Morfologia Funcional do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Amazonas (LMF/DM/UFAM).



Figura 1. Exemplar de *Podocnemis unifilis*. (tracajá).

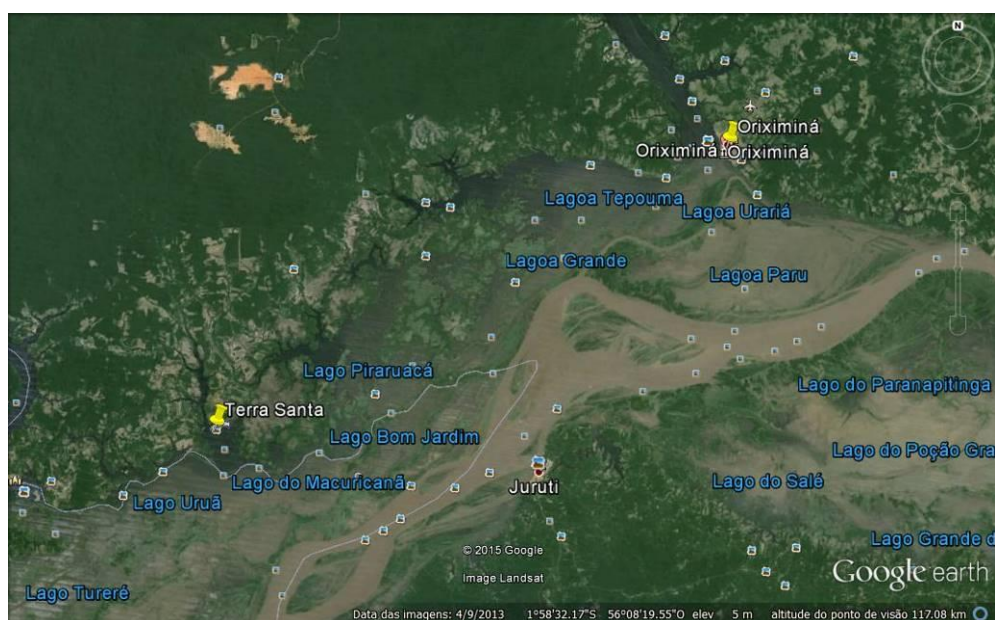


Figura 2- Localidade de origem dos tracajás recém-eclodidos. Municípios de Terra Santa e Oriximiná, localizados no estado do Pará (imagem retirada do Google Earth).

3.2 Coleta de sangue

Antes da eutanásia dos animais, amostras de sangue foram retiradas da veia femoral por meio de uma seringa de 1 ml previamente heparinizada repassado para tubos de ensaio contendo heparina, o anticoagulante utilizado em tartarugas para obtenção de plasma. Este sangue foi armazenado em local refrigerado. O tempo entre a coleta e a centrifugação não passou de uma hora. O plasma foi separado por meio de centrifugação (5.000 rpm por 1 minuto) do sangue total e foi posteriormente

armazenado em -60°C para as análises dos hormônios esteróides (testosterona, progesterona e estradiol) pelo método ELISA.

3.3 Análises dos hormônios esteroides

As amostras de plasma foram analisadas por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), específicos para a testosterona, estradiol e progesterona. Para a análise as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e numeradas para identificação. Os hormônios: testosterona, progesterona e estradiol foram avaliados conforme metodologia abaixo descrita.

3.3.1 Extração dos hormônios

Para extração das amostras para análises dos hormônios o líquido de 50 μl de plasma foi diluído em cinco vezes a quantidade do solvente, Éter etílico ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$), fortemente homogeneizado. A camada superior foi separada. O processo foi repetido por três vezes. A evaporação do solvente foi feita em uma nuvem de nitrogênio aquecida a uma temperatura de 30°C . O extrato será diluído em tampão então essa amostra será utilizada para análise hormonal.

3.3.2 Protocolo de ensaio

Foi incubada 50 μl da amostra por 2 horas (Testosterona) ou 1 hora (Estradiol; Progesterona) em temperatura ambiente sobre agitação, a reação foi desenvolvida imediatamente após a adição de 250 μl do Reagente de Ellman (Ellman's Reagent), a leitura foi realizada em comprimento de onda de 405 nm (Figura 3). A concentração de Testosterona, Progesterona ou Estradiol foi realizada utilizando uma equação logística de quatro parâmetros a partir de uma curva de calibração.

3.3.3 Princípio descritivo do ensaio

a) Testosterona: O kit ELISA Ache Químico da Cayman foi usado para testosterona. O imunoensaio enzimático (ELISA) baseia-se no princípio de competição entre a testosterona livre e a testosterona conjugada a enzima acetilcolinesterase. Devido a concentração de testosterona conjugada ser constante enquanto que a concentração de testosterona no plasma varia, a concentração de testosterona conjugada se liga ao anticorpo de testosterona e depois da incubação, a concentração de testosterona no plasma é inversamente a concentração de testosterona conjugada na amostra e vice-versa. Este complexo anticorpo testosterona que se liga ao anticorpo monoclonal anti coelho GG tem sido previamente imobilizado na placa. A placa foi lavada para remover

os agentes que não se ligaram, então o reagente de Ellman que contém substrato para acetilcolinesterase é adicionada na placa. O produto desta reação enzimática tem uma cor distintamente amarelada e absorve luz fortemente de 412 nm. A intensidade da cor é determinada espectrofotometricamente e proporcional, ou seja, a testosterona presa a acetilcolinesterase que é inversamente proporcional a testosterona livre presente na placa durante a incubação.

b) Estradiol (E2): O kit ELISA Ache Químico da Cayman foi usado para estradiol. O imunoensaio enzimático (ELISA) baseia-se no princípio de competição entre o estradiol livre e o estradiol conjugada a enzima acetilcolinesterase. Devido a concentração de estradiol conjugada ser constante enquanto que a concentração de estradiol no plasma varia, a concentração de estradiol conjugada se liga ao anticorpo de estradiol e depois da incubação, a concentração de estradiol no plasma é inversamente a concentração de estradiol conjugada na amostra e vice-versa. Este complexo anticorpo estradiol que se liga ao anticorpo monoclonal anti coelho GG tem sido previamente imobilizado na placa. A placa foi lavada para remover os agentes que não se ligaram, então o reagente de Ellman que contém substrato para acetilcolinesterase é adicionada na placa. O produto desta reação enzimática tem uma cor distintamente amarelada e absorve luz fortemente de 412 nm. A intensidade da cor é determinada espectrofotometricamente e proporcional, ou seja, o estradiol presa a acetilcolinesterase que é inversamente proporcional a estradiol livre presente na placa durante a incubação.

c) Progesterona: O kit ELISA Ache Químico da Cayman foi usado para progesterona. O imunoensaio enzimático (ELISA) baseia-se no princípio de competição entre a testosterona livre e a progesterona conjugada a enzima acetilcolinesterase. Devido a concentração de progesterona conjugada ser constante enquanto que a concentração de progesterona no plasma varia, a concentração de progesterona conjugada se liga ao anticorpo de progesterona e depois da incubação, a concentração de progesterona no plasma é inversamente a concentração de progesterona conjugada na amostra e vice-versa. Este complexo anticorpo progesterona que se liga ao anticorpo monoclonal anti coelho GG tem sido previamente imobilizado na placa. A placa foi lavada para remover os agentes que não se ligaram, então o reagente de Ellman que contém substrato para acetilcolinesterase é adicionada na placa. O produto desta reação enzimática tem uma cor distintamente amarelada e absorve luz fortemente de 412 nm. A intensidade da cor

é determinada espectrofotometricamente e proporcional, ou seja, a progesterona ligada a acetilcolinesterase que é inversamente proporcional a progesterona livre presente na placa durante a incubação.



Figura 3- Leitora de microplaca com a placa para leitura de nível de testosterona.

.3.4 Histologia e quantificação das gônadas.

Após a sexagem visual, as gônadas previamente fixadas foram desidratadas em radiente de etanol (80% e 96%) e emblocadas em resina metacrilato. As secções (cortes) foram obtidas em 5µm e corados em Hematoxilina de Carazzi e eosina aquosa (HE). Adicionalmente, algumas amostras foram coradas em azul de toluidina (0.12%) e Tricrômico de Mallory (Fast green 1%, Ácido fosfotungúístico 1% e Orange G. 2%) .

Conforme Malvasio (2012), a identificação dos indivíduos dos machos imaturos é feita pela observação no testículo por cordões medulares nas gônadas com a presença de células esféricas ou planas, com núcleo densamente corado, espermatogônias, no interior de estruturas tubulares, aderidas ao epitélio seminífero. No interstício algumas células poliédricas, denominadas células de Leydig. Nas fêmeas, as gônadas (os ovários)

caracterizam-se histologicamente pela presença de epitélio germinativo espesso e bem desenvolvido, região medular mais homogênea e indiferenciada. Além disso, o oviduto é comprido e bem desenvolvido (Danni E Alho, 1985; Hidelbrand e Goslow, 2006).

A quantificação das estruturas presentes nas gônadas foi realizada pelo software Stepanizer (<http://www.stepanizer.com>), no qual foram utilizados um sistema de testes (sondas estereológicas ou grids) com 144 intersecções (Figura 4) dependendo da estrutura avaliada. Os componentes gonadais quantificados nas fêmeas foram: na região cortical compreendia as oogônias e as células foliculares e a região medular, o interstício e vasos. Nos neonatos do sexo masculino contabilizamos no interior dos cordões seminíferos as células de Sertoli e as espermatogônias e no interstício os vasos.

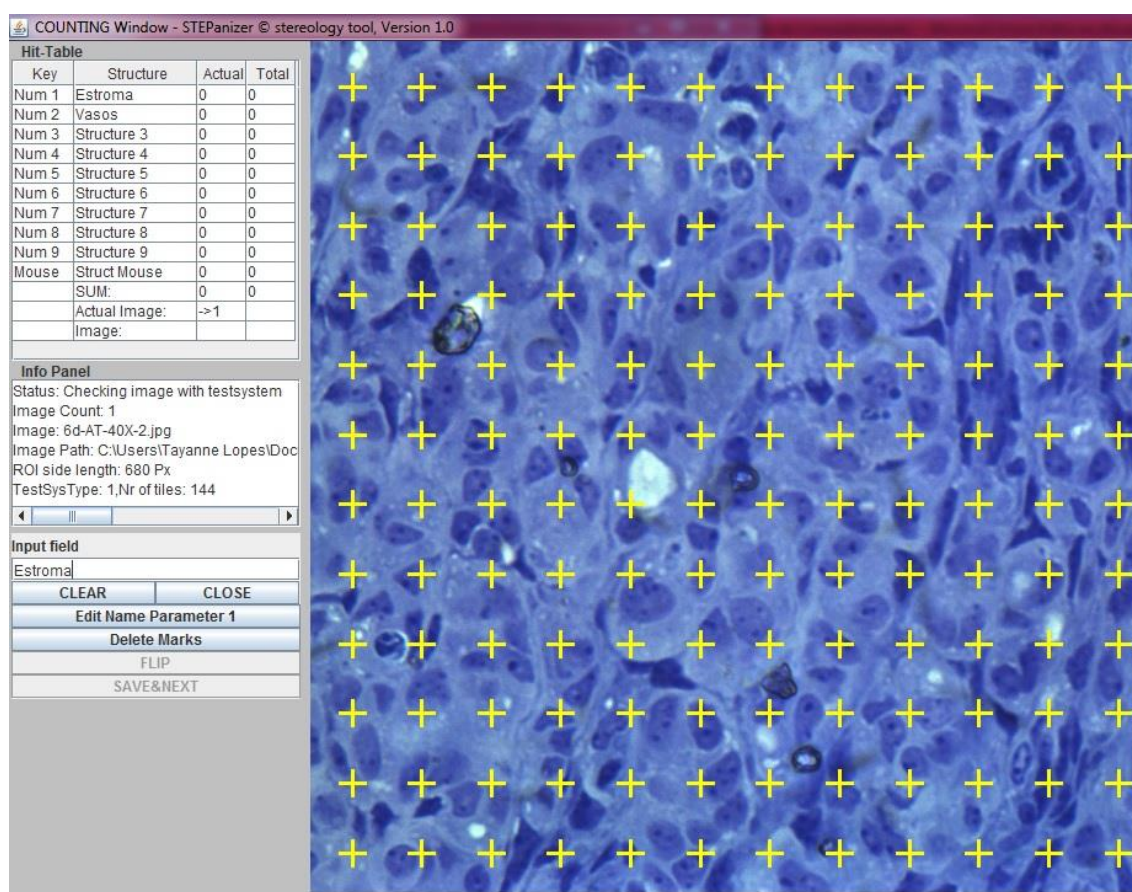


Figura 4- Exemplo de um sistema de intersecções (sondas estereológicas) do software Stepanizer sobrepostas em uma imagem digitalizadas da histologia do ovário de um neonato de *P. unifilis*. A densidade de volume (dv, %) dos componentes gonadais foi quantificada como sendo o percentual das estruturas presentes na imagem projetada.

3.5 Sexagem Visual

As análises macroscópicas foram realizadas após a dissecação do animal em decúbito dorsal (Figura 2). O plastrão foi separado da carapaça com auxílio de uma tesoura e tornando possível a visualização das gônadas (Figura 3). A sexagem foi realizada conforme os critérios descritos por Malvasio et al., (2002). Vogt (1994) salienta que é relativamente seguro utilizar técnicas anatômicas para a identificação sexual dos filhotes de tartarugas, tendo em vista que as gônadas de machos são mais alongadas e com maior diâmetro que as gônadas das fêmeas. Porém, um observador inexperiente ou não familiarizado com os componentes anatômicos da espécie pode encontrar dificuldades para distinguir os sexos. Na prática, isso tem acrescentado inúmeros erros nas análises, principalmente quando diferentes observadores participam da mesma amostragem. Para reduzir o viés amostral, apenas um observador participou da sexagem visual. Após isso, imagens (Figura 3) das gônadas foram obtidas utilizando um estereomicroscópio da marca Leica com uma câmera de vídeo acoplada para análises futuras. Após as análises das gônadas, esses tecidos foram inteiramente fixados em (GTA, 25%), tamponado (pH 7,3) em fosfato de salina para evitar decomposição ou alterações indesejadas antes do processamento histológico.

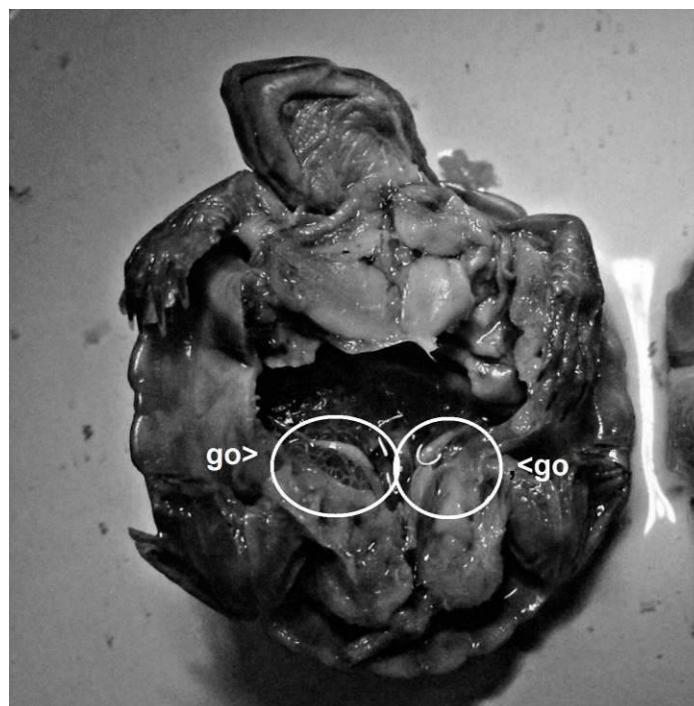


Figura 5- Exemplar de tracajá com o plastrão removido para observação e retirada das gônadas (go: gônadas).

3.6 Análises estatísticas

Os dados estão apresentados como média e erro padrão da amostra. Apesar de analisarmos 47 animais, foram encontrados apenas 2 indivíduos machos. O baixo número amostral de machos não permitiu comparações entre sexo. Portanto, o trabalho tornou-se meramente descritivo e sem comparações estatísticas.

4. RESULTADOS

4.1 Características macroscópicas da gônada

As gônadas de recém-eclodidos são órgãos pares localizados na cavidade celomática, estendendo-se do peritônio que sobrepõe os pares de rins para os pulmões, com diâmetro a partir de 1 a 2 mm. As gônadas ainda encontravam-se muito imaturas, o que dificultou a análise visual dos indivíduos até mesmo a identificação histológica. Indivíduos sexados como machos foram identificados visualmente com gônada de textura lisa, na cor do branco pálido ao alaranjado e de forma aproximadamente fusiforme (Figura 6D). Enquanto que as gônadas femininas possuíam um aspecto granuloso, pode-se descrevê-la como uma estrutura com coloração variando de esbranquiçada para translúcida, o oviduto encontrava-se lateralmente a gônada e ultrapassava região dos rins, ligado ao um tecido de cor preta (Figura 6B). Dois indivíduos foram atribuído como intersexo. O termo refere-se a um indivíduo de qualquer espécie que exibe ambas as características de sexo masculino e feminino (Limpus et al., 1982).

A avaliação foi realizada com bases nos critérios de Malvásio (2002) (Tabela 1) e realizada por dois observadores independentes (LMF1, Laboratório de Morfologia Funcional 1 versus LMF2, Laboratório de Morfologia Funcional 2). Os resultados foram distintos ($p < 0,01$) e apresentou um baixo coeficiente de correlação de Spearman ($r^2 = 0,37$). Imprevisivelmente o observador mais experiente do LMF1 apresentou um menor grau de acerto (48%). Com base na histologia das gônadas, o observador LMF1 obteve um alto coeficiente de correlação de Spearman ($r^2 = 0,01$) e foi considerado altamente significativo ($p < 0,903$). Enquanto que o observador menos experiente apresentou um grau de acerto um pouco maior (64%), apresentando uma alta

sinificancia ($p < 0,896$) e um coeficiente de correlação alto ($r^2 = 0,01$) com base nas análises histológicas.

Tabela 1- Estruturas, características gônadais e critérios para distinguir o sexo em juvenis e recém-eclodidos de tartarugas.

Estrutura	Características	Critério
Ducto Parasonéfrico	Posição	Lateralmente ou sobre a gônada
	Tamanho	Pequeno, médio ou grande
Gônada	Forma	Fusiforme ou arredondada
	Tamanho	Pequena, média ou grande
	Textura	Lisa ou granular
	Cor	Branca, amarelada ou translúcida

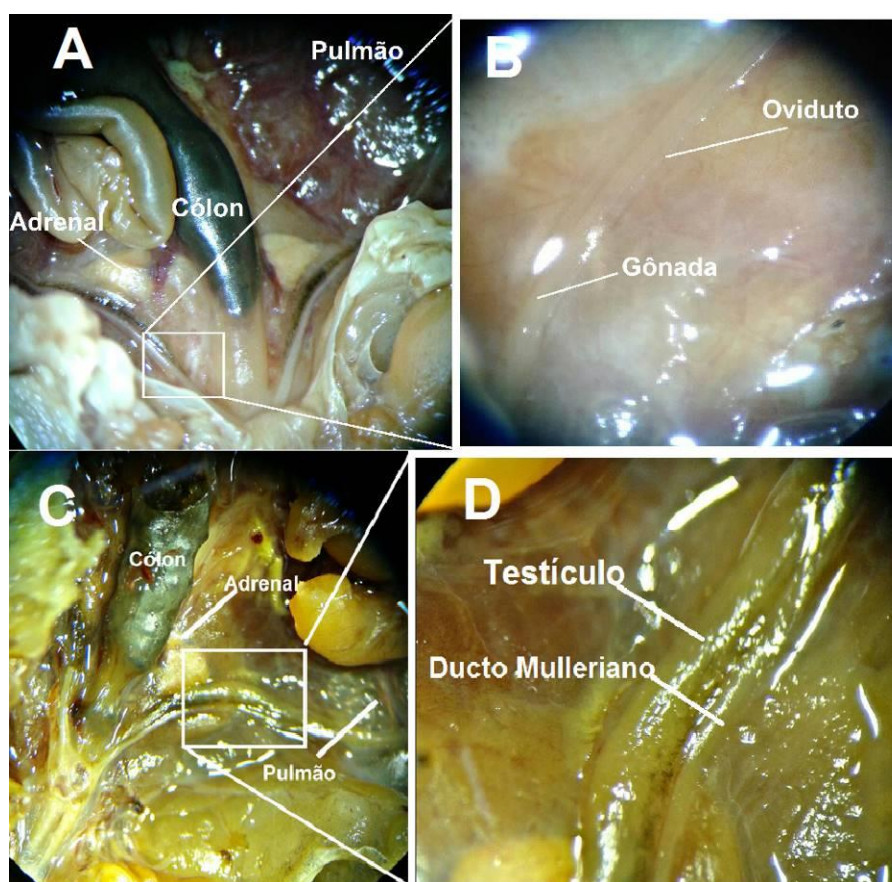


Figura 6- Visualização das gônadas de uma fêmea (A/B) e um macho (C/D) recém-eclodidos de *P. unifilis*, logo após a evisceração.

4.2 Sexagem histológica e Morfometria das gônadas

Dos indivíduos analisados 100% foram identificadas como fêmeas (n= 46) e outros animais oriundos de ninhoss do ano anterior foram identificados com machos (n= 5). O diagnóstico de sexo foi baseado no desenvolvimento das regiões corticais e células germinativas e presença ou ausência de cordões seminíferos (Ver tabela 2). Nas gônadas femininas, o ovário e o oviduto são bem visíveis. Nas seções histológicas, o epitélio germinativo pode ser visto na superfície do ovário (córtex) e o estroma medular, abaixo do epitélio germinativo, desorganizado e bem pouco desenvolvido (Figura 7A). Já o oviduto apresenta uma região luminal revestido por um epitélio colunar simples semelhante às características encontradas em *Podocnemis expansa* (PIB-B/0080/2014-2015). Na região cortical do ovário (correspondente ao epitélio germinativo) encontram-se as oogônias formando folículos ovarianos primordiais (Figura 7B).

Tabela 2 - Sumário da caracterização histológica de gônadas de filhotes.

Descrição das estruturas histológicas			Espécies/Autor
Fêmeas	Machos	Intersexos	
Ovário dividido em duas regiões distintas (epitélio germinativo e região medular); Oócitos em desenvolvimento;	Cordões seminíferos em desenvolvimento com ausência do lúmen.	Não descrita	<i>Podocnemis expansa</i> e <i>Podocnemis unifilis</i> , (Malvasio, 2012); <i>Podocnemis expansa</i> (PIB-B/0080/2014-2015)
Estroma desorganizado	Estrutura medular mais organizada; Células germinativa usualmente visíveis	Epitélio germinativo parcialmente desenvolvido; Estroma medular com cordões em desenvolvimento.	<i>Chelonia mydas</i> (Miller and Limpus, 1981)

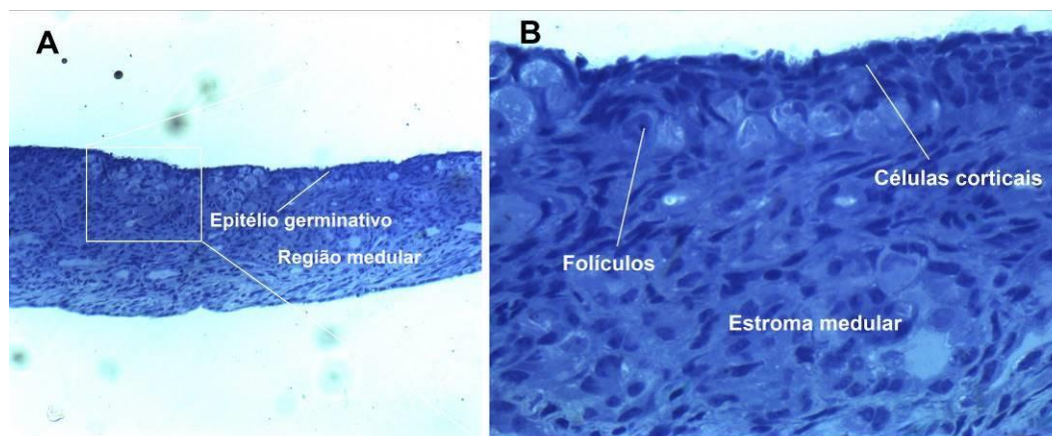


Figura 7- Corte histológico de um aparelho reprodutivo da fêmea de *Podocnemis unifilis* (A), com objetiva de 20X, destacando o epitélio germinativo (B), obtido por microscopia óptica em aumento de 40X (seção em 5 μ c, Azul de toluidina).

Nas análises dos componentes gonadais das fêmeas, se considerarmos apenas o epitélio germinativo, 78,36% são células foliculares e 21,64% correspondem á oogônias. Na região medular, os vasos ocupam <2% das estruturas presentes no estroma medular (Figura 5D).

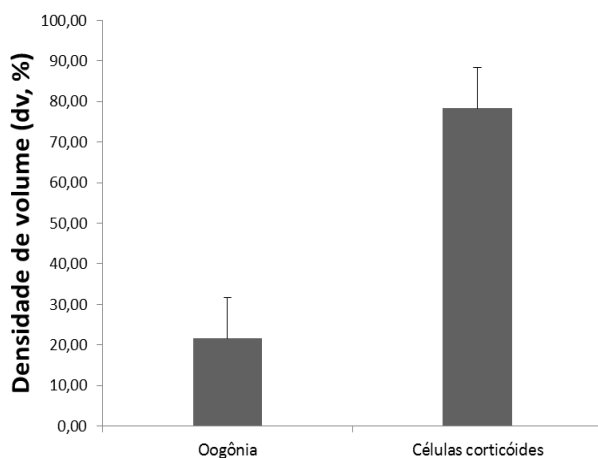


Figura 8. Proporção relativa de oogônias e células corticais no ovário de *Podocnemis unifilis*.

A caracterização histológica dos machos revelou que nos testículos (6A) observam-se estruturas tubulares denominadas de cordões seminíferos. Estes cordões seminíferos são revestidos por um eptélio seminífero onde são encontradas células da linhagem espermatogênica e células de Sertoli (Figura B). A região luminal é ausente nos túbulos seminíferos. Um estroma de tecido conjuntivo circunda os túbulos

seminíferos e abriga as células de Leydig e as células mióides peritubulares ligadas umas as outras por tecido conjuntivo.

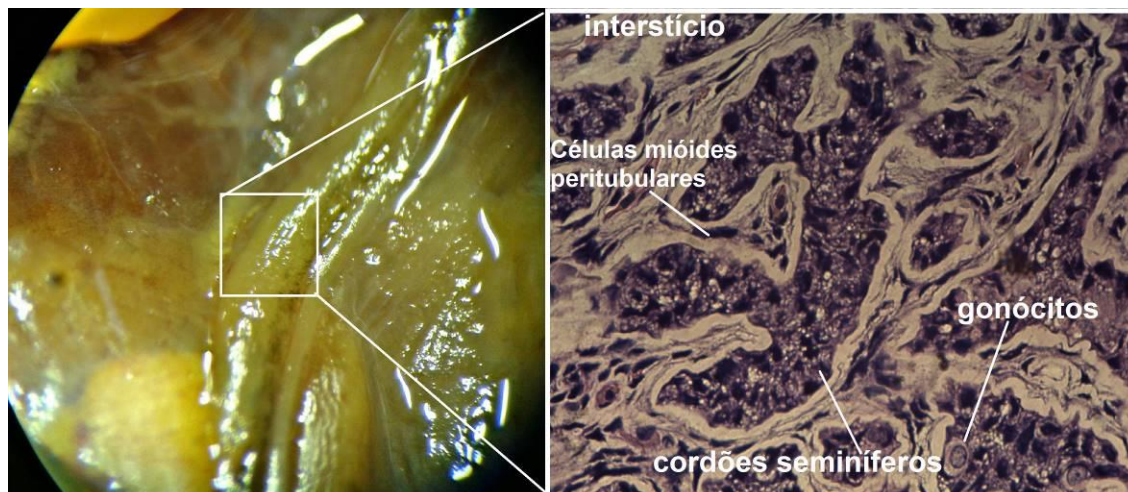


Figura 91- Anatomia (A) e histologia (B) do aparelho reprodutivo do macho imaturo de *Podocnemis unifilis* de, destacando o cordão seminífero, obtido por microscopia óptica em aumento de 40X (seção em 5 μ c, HE).

No interior dos cordões seminíferos a presença de células de Sertoli correspondem a (>17%) e os gonócitos mais numerosos com um percentual de 83% (7C). Os vasos ocupam menos de 6% dos componentes estruturais presentes na região intersticial.

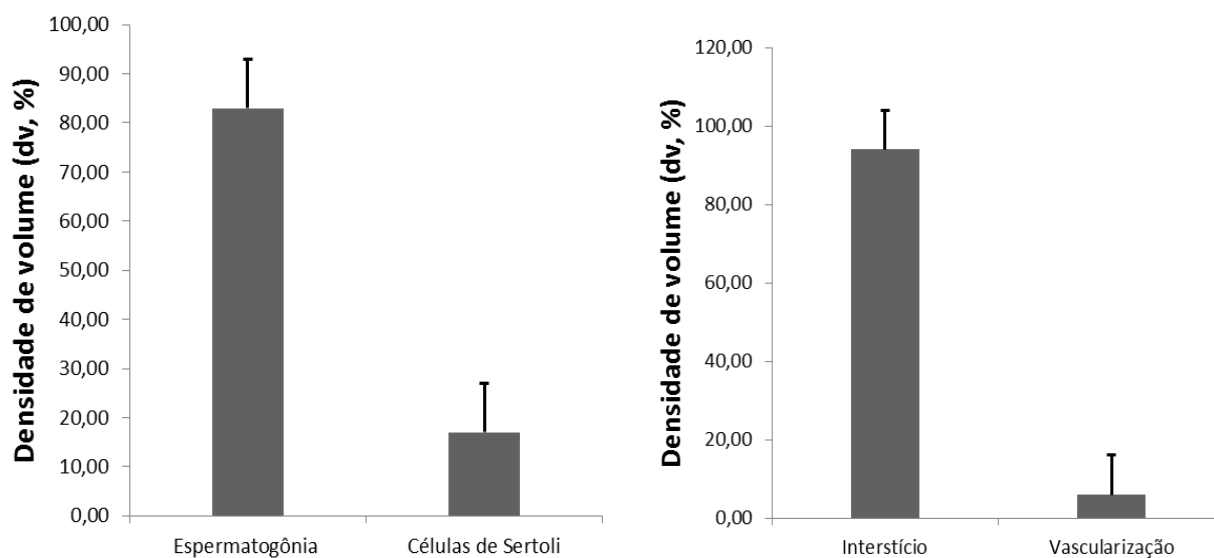


Figura 9. Proporção relativa de células de Sertoli e espermatogônias e de tecido vascular no interior do interstício.

4.4 Níveis hormonais

Como todos os indivíduos foram sexados como fêmeas na identificação histológica, não foi possível estabelecer um intervalo de confiança dos dados da relação E2:T, para separar indivíduos do sexo masculino e feminino, devido. Com isso, impossibilitou que os animais fossem categorizados, dado à ausência de dados hormonais para machos de *Podocnemis unifilis* (Tabela 4).

Em *P. unifilis*, os valores mínimos e máximos encontrados para testosterona, estradiol e progesterona em fêmeas foram respectivamente 5,09 e 12,36 pg/ml; 3,09 e 16,48 pg/ml; 6,32 e 47,67 pg/ml.

Sexo	Testosterona (T)	Estradiol (E2)	Progesterona	Espécie/Autor
Macho ♂ Fêmea ♀	0,186 ± 0.058 pg/ml 0,105 ± 0.030 pg/ml	0,132 ± 0.037 pg/ml 0,205 ± 0.050 pg/ml	Não há descrição	<i>Chelonia mydas</i> (Xia, 2011).
Macho ♂ Fêmea ♀	2,6±1,1 ng/ml 1,6±0,3 ng/ml	0,38±0,15 ng/ml 0,09±0,02 ng/ml	1,17±0,41 ng/ml 2,16±0,92 ng/ml	<i>Podocnemis expansa</i> (PIB-B/0080/2014-2015).
Macho ♂ Fêmea ♀	Não há descrição 8,38±1,76 pg/ml	Não há descrição 4,86±1,51 pg/ml	Não há descrição 22,06±11,07 pg/ml	<i>Podocnemis unifilis</i> (PIB-B/0070/2015-2016).

5. DISCUSSÃO

5.1 Sexagem e anatomia das gônadas

O dimorfismo sexual em quelônios torna-se evidente apenas na vida adulta, com os machos que mostram caudas mais longas do que as fêmeas e grandes garras desenvolvidas sobre patas dianteiras usadas para prender as fêmeas durante a cópula (Owens, 1997). Por não terem dimorfismo sexual e havendo a necessidade em determinar o sexo de grandes números de tartarugas em um grupo, tornou se necessário a utilização de uma técnica confiável e de fácil aplicação (Owens et al. 1978).

Portanto, a determinação do sexo pelo exame visual das gônadas e estruturas associadas, durante a dissecação de indivíduos mortos é certamente o método mais fácil e mais acessível sexagem em juvenis e tem sido amplamente utilizado em numerosos estudos (Por exemplo, Malvasio, 2002; Vogt, 1994; Bull & Vogt, 1979; Yntema, 1981; Casale et al., 2006; Lazar et al., 2006) .

A morfologia das gônadas masculinas e femininas é semelhante em todas as espécies de tartarugas e é bem descrito em literatura (Malvasio, 2002; Delgado, 2010; Wyneken, 2001; Miller & Limpus, 2003). No entanto, em filhotes pelo menos, a morfologia das gônadas não é considerada o melhor indicador do sexo e pode ser influenciado pela experiência de um observador (Whitmore et al., 1985). Em nosso estudo, os animais são provenientes de um período de incubação onde ocorreu um evento climático atípico, prejudicando seu desenvolvimento gonadal, muitos indivíduos eclodiram com gônadas muito imaturas implicando nos resultados da avaliação macroscópica. Os observadores apresentaram baixos graus de congruência com a histologia (o método mais seguro), no qual o observador mais experiente (LMF1) apresentou 48% e o observador pouco experiente (LMF2) 64%. Parcialmente isso pode explicado devido à diferença das características espécie-específicas e sazonais de cada espécie associada ao pequeno tamanho da gônada, onde na maioria das vezes é impossível distinguir um ovário de um testículo a olho nu (Vot, 1994). Yntema & Mrosovsky (1980), no qual concluem que para *Caretta caretta*, a análise das características morfológicas das gônadas não é suficiente para identificar o sexo do indivíduo, sendo necessária a avaliação histológica. Indivíduos de *Podocnemis expansa* da mesma localidade (Terra Santa/PA) e com o mesmo período de vida, até dez dias, conseguiram obter um grau de congruência de 85% de correspondência com a histologia, em um ano que não houve intervenção do El Niño. Um observador familiarizado com características pré-estabelecidas para sexagem irá encontrar dificuldades para identificar imaturos se deparado com uma população fortemente influenciada por fatores climáticos. Estudos anteriores descobriram que a cor das gônadas e textura eram ambíguas (Van der Heiden et al ., 1985; Whitmore et al., 1985 ;Wyneken et al., 2007); nosso estudo encontrou-os sendo inconsistente também. Na verdade, muitas variáveis podem influenciar a morfologia da superfície e cor de gônada como a desidratação da amostra, a decomposição e a presença de contaminação

microbiana, influência climática. Wyneken et al., (2007) descartou a presença de grânulos como critério para filhotes de *Caretta caretta*, afirmando que esta característica também varia sazonalmente e a considerou como um critério não confiável na identificação de sexo.

5.2 Identificação histológica das gônadas

Neste estudo, a precisão da avaliação visual foi verificada através de critérios histológicos das gônadas de tartarugas, que é considerado a metodologia mais precisa para diagnosticar o sexo (Mrosovsky e Benabib, 1990). Wibbels (2003) e Hamann et al., (2010) afirmam que o método mais preciso de filhotes de sexagem atualmente disponível é o exame histológico das gônadas de filhotes . Por essa razão, a identificação tem sido rotineiramente verificada por meio de histologia.

Durante o desenvolvimento embrionário o cume gonadal desenvolve a partir epitelial e a parte basal desenvolve os túbulos por volta do 17º estágio do desenvolvimento. Na crista genital, uma lâmina basal separa os cordões medulares epiteliais das células mesenquimas soltas do estroma gonadal (Merchant - Larios et al., 1989; Miller e Limpus, 2003). Durante esta fase as gônadas são ainda bipotenciais, uma vez que a diferenciação sexual ocorre apenas durante o período termossensível da embriogênese (Yntema e Mrosovsky, 1982). Este termossensível período (TSP) ocorre entre os estágios 22-27 (Miller, 1985), quando as ocorrer uma reorganização das células do gonadais primordias, tanto para o córtex e medula. O tempo para a diferenciação sexual é espécie-específico.

Assim como na morfologia anatômica das gônadas, histologicamente houve dificuldades para identificar o sexo destes indivíduos, por se encontrarem ainda muito imaturos. Alguns autores argumentam que gônadas podem ser consideradas morfológicamente e fisiologicamente imaturas em algumas espécies de tartaruga (Merchant- Larios, 1999; Mrosovsky e Benabib, 1990), sendo motivos de controvérsias entre muitos autores. Além disso, as gônadas das diversas espécies revelam variações no grau de diferenciação na eclosão, onde as condições ambientais tem uma alta influencia nesta etapa (Merchant - Larios, 1999).

Várias características histológicas do ovário de filhotes *P. unifilis* foram semelhantes as que foram relatadas anteriormente por outros, tais como em

Podocemis expansa (PIB-B/0080/2014-2015), onde em fêmeas os ovários são estruturas de forma irregular constituído por duas zonas: 1) a zona medular, a região mais interna; 2) a zona cortical mais superficial, com folículos ovarianos primordiais e circundados por células corticais. Também relatada em mamíferos, onde as regiões corticais e medulares são facilmente reconhecidas. A distinção também foi relatada em aves, embora nesta espécie a região medular fosse menos desenvolvida como em *Podocnemis unifilis* (Wyneken et al., 2007; Banks, 1992). A medula é formada por estroma com pequena vascularização, diferentemente a outros estudos onde ocorre uma alta vascularização, inclusive é utilizada como critério de sexagem nos estudos de Malvasio, (2012).

Histologicamente, machos foram identificados pela presença de túbulos seminíferos imaturos na região medular, com um epitélio superficial monoestratificado peculiaridades relatado também em *Caretta caretta*, por Vogt, (1994). Observamos a presença de um par de ductos müllerianos. Como em mamíferos, os ductos de Müller estão presentes nos embriões de ambos os sexos, no momento em que as gônadas estão bipotenciais, mas somente nas fêmeas eles desenvolvem-se em órgãos reprodutivos. Nos machos, ocorre degeneração, sob a influência de HAM ou hormônio antimülleriano, secretado pelas células de Sertoli e, como resultado, o desenvolvimento de Müller é inibido. (Yazawa et al., 2015). No interstício, pode ser visto a presença de células de Leydig estas células secretam uma hormônio que desempenha um papel no estabelecimento e manutenção das características sexuais masculinas secundárias (Wilhelm et al., 2007).

Como 2015 experimentou o fenômeno climático El Niño (temperaturas mais altas), decidimos comparar os níveis pluviométricos registrados no período de incubação destes indivíduos, de setembro a dezembro de 2015, com a proporção sexual destes filhotes. Para Packard et al., (1985), os ambientes hídrico e térmico estão intimamente relacionados. A ausência de chuva ocasiona climas mais quentes, no qual se esperaria que as temperaturas maiores produzissem um aumento no sexo feminino dentro da proporção sexual. Se por um lado a umidade não influencia a determinação sexual é quase um consenso a importância do ambiente hídrico no sucesso da eclosão, na taxa de desenvolvimento embrionário e no tamanho dos filhotes (Foley et al., 2000; Tucker & Paukstis, 2000). Como esperado, observamos que devido a este fato ocorreu uma feminilização da população com a identificação de 100% fêmeas. Não fomos

capazes de obter registros de temperatura da praia de Terra Santa e Oriximiná, portanto, foram utilizados os registros pluviométricos fornecidos pelo Hidroweb ANA (Agência nacional de águas) (<Http:// <http://www2.ana.gov.br/>>) da praia mais próxima em Oriximiná. Durante o mês de setembro a dezembro de 2015 houve a ocorrência de 14 picos de chuvas, todas essas categorizadas em chuvas fracas (Precipitação cuja intensidade é menor do que 5,0 mm/h) á chuvas moderadas (Precipitação cuja intensidade está compreendida entre 5,0 e 25 mm/h). A ausência de chuvas elevou a temperatura da região, consequentemente afetou todos os estágios reprodutivos da espécie, a desova, o desenvolvimento embrionário e eclosão dos filhotes. Estes resultados não refletem necessariamente um efeito negativo do aquecimento global, este é apenas um estudo de um ano. Para obter dados mais precisos em relação tendência da proporção do sexo nesta praia, é necessário para um banco de dados que nos permite prever relações sexuais ao longo do tempo (modelagem população) como discutido por Mrosovsky & Godfrey (2010), levando em conta os acontecimentos climáticos como El Niño, La Niña e alterações climáticas contemporâneas. Uma alteração no ciclo das chuvas e enchentes provavelmente causará impactos diretos nas populações de quelônios da família Podocnemididae na Amazônia (Eisemberg et al. 2015). Com areias cada vez mais quentes, a população pode se tornar majoritariamente feminina, colocando em risco a própria sobrevivência da espécie.

6. REFERÊNCIAS

- Andrade, P. C. M.; Oliveira, P. H. G.; Almeida Jr., C. D.; Oliveira, A. B.; Medeiros, H. C.; Barbosa, E. S.; Rodrigues, W. S.; Nascimento, J. P.; Anizio, T. L. F.; Lima, G.; Mendoça, L.; Lima, A. O.; Coelho, J. D.; Silva, F. M.; Silva, A. F. & Silva, A. F. (2012). Parâmetros de estrutura e dinâmica populacional e manejo extensivo de quelônios (*Podocnemis spp.*) na Reserva Extrativista do Médio Juruá. In: Andrade, P. C. M. (Ed.). Manejo comunitário de quelônio no Médio Amazonas e Juruá – Projeto-pé-de-pincha. Manaus, 375-442.
- Bonach, K.; Malvasio, A.; Matushima, E. R. & Verdade, L.M. (2011). Temperature-sex determination in *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae). Série Zoologia, 101(3): 151-155.

- Ceriani, S. A. & J. Wyneken. (2008). Comparative morphology and sex identification of the reproductive system in formalin preserved sea turtle specimens. *Zoology*, 111: 179-187.
- Fachin-Teran, A. & Vogt, R. C. (2004). Estrutura populacional, tamanho e razão sexual de *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) no rio Guaporé (RO), norte do Brasil. *Phyllomedusa*, 3(1): 29-42.
- Gross, T. S.; Crain, T. S.; Bjorndal, K. A.; Bolten, A. B. & Carthy, R. R. (1995). Identification of sex in hatchling loggerhead turtles (*Caretta caretta*) by analysis of steroid concentrations in chorioallantoic/amniotic fluid. *General and Comparative Endocrinology*, 99: 204-210.
- Larios, H. M. (1999). Determining hatchling sex. In: Eckert, K.L.; Bjorndal, K.A.; Abreu-Grobois, F.A. & Donnelly, M. (Eds.). *Research and management techniques for the conservation of sea turtles*. Washington, DC: IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication, 4: 130–135.
- Malvasio, A.; Gomes, N. & Farias, E. C.; (1999). Identificação sexual através do estudo anatômico do sistema urogenital em recém-eclodidos e jovens de *Trachemys dorbignyi* (Duméril & Bibron) (Reptilia, Testudines, Emydidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 16(1): 91 – 102.
- Malvasio, A.; Rocha, J. M. N. & Santos, H. D.; (2012). Morfometria e histologia das gônadas de machos e fêmeas recém-eclodidos de *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae). *Acta Scientiarum*, 34(1): 105-112.
- Malvasio, A.; Souza, A. M.; Reis, E. S. & Farias, E. C. (2002). Morfologia dos órgãos reprodutores de recém eclodidos de *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) e *P. unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Pelomedusidae). *Publicações avulsas – Instituto Pau Brasil de História Natural*, 5: 27-37.
- Owens, D. W. (1997). Hormones in the life history of sea turtles, In: Lutz, P. L. & Musick, J. A. *The Biology of Sea Turtles Volume I*, Boca Raton: Florida, CRC Press, 315-341.
- Vogt, R.C. (1994). Temperature controlled sex determination as a tool for turtle conservation. *Chelonian Conservation and Biology*. 1(2):159-162.
- Wibbels, T. (2003). Critical approaches to sex determination in sea turtles, In: Lutz, P. L.; Musick, J. A. & Wyneken, J. *The Biology of Sea Turtles Volume II*. Boca Raton: Florida, CRC Press, 2: 103-134.
- Xia, Z. R.; Li, P. P.; Gu, H.X., Fong, J. J. & Zhao, E. M. (2011). Evaluating noninvasive methods of sex identification in green sea turtle (*Chelonia mydas*) hatchlings. *Chelonian Conservation and Biology*, 10:117- 123.

Yntema, C. L. & Mrosovsky, N. (1980). Sexual differentiation in hatchling loggerheads *Caretta caretta* incubated at different controlled temperatures. *Herpetologica*, 36: 33-36.