



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



**Sexagem em tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*
Schweigger 1812) baseado na fisiologia hormonal, anatomia e
histologia das gônadas**

Bolsista: Tayanne da Silva Lopes, CNPq.

Manaus
2015



**Universidade Federal do Amazonas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**

Departamento de Pesquisa

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica



**RELATÓRIO FINAL
PIBIC: PIB-B/0080/2014-2015**

**Sexagem em tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*
Schweigger 1812) baseado na fisiologia hormonal, anatomia e
histologia das gônadas**

Bolsista: Tayanne da Silva Lopes

Orientador: Prof. Dr. Wallice Paxiúba Duncan

Corientador: Prof. Dr. Paulo César Machado Andrade

**Manaus
2015**

RESUMO

Considerando as dificuldades na identificação do sexo em filhotes de tartarugas, além do uso de métodos invasivos para a sexagem, vários métodos alternativos têm sido propostos. Muitos dos quais são imprecisos e requer cautela para se estabelecer a razão sexual de uma prole. Com isso, a análise hormonal tem sido sugerida como um procedimento alternativo. Para tanto, faz-se necessária uma minuciosa análise do perfil de hormônios esteróides, descrição histológica dos componentes gonadais e avaliação anatômica das gônadas dos recém-eclodidos. Esses aspectos foram examinados em 48 exemplares neonatos de tartarugas-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*). Nos mesmos animais foram obtidos os perfis de testosterona, estradiol e progesterona plasmáticos. A sexagem visual foi baseada na biópsia gonadal, enquanto a identificação sexual foi estabelecida pela análise histológica das gônadas. Além disso, nós avaliamos o grau de erro cometido por examinadores com diferentes níveis de experiência. A sexagem definitiva foi baseada na presença de componentes ovarianos ou testiculares, os quais foram quantificados em cada animal. Todos os métodos de sexagem (hormonal e visual) foram significativamente associados ao sexo identificado pela análise histológica. Para a sexagem visual, o grau de acerto depende da experiência do examinador. Obviamente, quanto mais experiente maior o grau de acerto (84,4% versus 72,2). Os erros estão associados aos equívocos considerados na identificação dos componentes anatômicos das gônadas. Durante a sexagem visual, a vascularização da gônada é normalmente um critério utilizado. Nas análises estereológicas, nós observamos que a densidade de vasos nos ovários e testículos é semelhante. Isso significa que a vascularização gonadal pode não ser um critério preciso para identificar o sexo dos recém-eclodidos de tartaruga-da-Amazônia. Nos machos, as células de Sertoli são mais numerosas que os gonócitos. Além disso, os gonócitos podem ser encontrados tanto na região central quanto na periferia dos cordões seminíferos. Nas fêmeas, os ovários se diferenciam dos testículos pela espessura do epitélio e pela região do estroma pouco organizado. Em relação aos teores dos hormônios esteróides, os filhotes do sexo feminino apresentam elevados níveis de estradiol (E₂) e progesterona, enquanto que os machos possuem alto teor de testosterona (T). Com isso, a relação E₂:T permitiu diferenciar as fêmeas dos machos (sexagem hormonal). A correspondência entre a sexagem hormonal e a histológica foi de 96,6%, ou seja, é superior à sexagem baseada na anatomia (visual) das gônadas. Com base nisso, a análise dos níveis hormonais apresenta-se com uma ferramenta promissora para sexagem de uma grande quantidade de indivíduos dentro de uma prole de tartaruga-da-Amazônia.

Palavras chave: Podocnemididae; Recém-eclodidos; Gônadas; Histologia; Hormônios

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	Métodos de sexagem em tartarugas.....	01
1.2	A espécie <i>Podocnemis expansa</i> (Schweigger, 1812).....	02
2	HIPÓTESES.....	03
3	OBJETIVOS	04
3.1	Geral.....	04
3.2	Específico do projeto.....	04
4	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	04
4.1	Obtenção dos animais e visualização das gônadas.....	04
4.2	Coleta de sangue.....	05
4.3	Análises dos hormônios esteroides.....	05
4.4	Histologia e quantificação das estruturas gonadais.....	06
4.5	Análises macroscópicas.....	07
4.6	Análise estatística	08
5	RESULTADOS	08
5.1	Sexagem visual e anatomia das gônadas	08
5.2	Sexagem histológica e morfometria das gônadas.....	09
5.3	Relações entre as estruturas gonadais e os níveis dos hormônios esteróides plasmáticos.....	12
5.4	Hormônios esteroides e sexagem hormonal.....	13
6	DISCUSSÃO	14
6.1	Sexagem e anatomia das gônadas	14
6.2	Identificação histológica das gônadas	15
6.3	Níveis hormonais.....	17
7	CONCLUSÕES	19
8	REFERÊNCIAS	20
9	COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADAS AO PROJETO (ANEXOS)	24

Lista de Tabela

Tabela 1. Biometria (mm) dos animais utilizados nas análises: comprimento (comp) de carapaça, largura da carapaça, comprimento (comp) do plastrão, largura do plastrão e peso (g)	5
--	---

Lista de Figuras

Figura 1. Exemplar neonato de <i>Podocnemis expansa</i> (tartaruga-da-Amazônia)	5
Figura 2. Exemplo de um sistema de intersecções (sondas estereológicas) do software Stepanizer sobrepostas em uma imagem digitalizadas da histologia do testículo de um neonato de <i>P. expansa</i> . A densidade de volume (dv, %) dos componentes gonadais foi quantificada como sendo o percentual das estruturas presentes na imagem projetada.	7
Figura 3. Visualização macroscópica (anatômica) das gônadas de uma <u>fêmea</u> (A) e um <u>macho</u> (B) recém-eclodidos de <i>Podocnemis expansa</i> durante a sexagem.	8
Figura 4. Cavidade visceral de uma fêmea evidenciando ovários e oviduto (A). Detalhes histológicos do epitélio germinativo e região medular (B). Observa-se ainda detalhes das células colunares altas que revestem a luz do oviduto (C). As oogônias e células foliculares podem ser observadas na região cortical (D). As escalas correspondem: (A) 2 mm, (B) 100 µm, (C) 50 µm, (D) 10 µm.	11
Figura 5. Anatomia e histologia de um ovário e oviduto (A). Proporção relativa de tecido epitelial germinativo e região medular (B), células foliculares e oogônias no epitélio germinativo (C) e densidade de vasos no estroma medular, interstício (D).	5
Figura 6. A) Cavidade visceral de neonato macho de tartaruga mostrando os testículos e o ducto Mülleriano residual (A). Histologia do testículo mostrando a presença de cordões medulares (cordões seminíferos) (B). Fotomicrografia do ducto Mülleriano residual (C). Detalhes dos cordões seminíferos mostrando as células de Sertoli e gonócitos com vacuolizações citoplasmáticas, células mióides peritubulares e a região intersticial (D). As escalas correspondem: (A) 2 mm, (B) 100 µm, (C) 100 µm, (D) 20 µm.	11
Figura 7. Anatomia e detalhe histológico do testículo e ducto Mülleriano residual de um filhote macho de tartaruga (A). Proporção relativa de cordões seminíferos e de interstício no testículo (B). Considerando apenas o epitélio germinativo, a densidade de volume das células de Sertoli e gonócitos (C). Proporção de tecido vascular no interior do interstício (D).	12
Figura 8. Relações entre as estruturas gonadais e os níveis de hormônios esteróides em filhotes fêmeas de tartaruga.	13
Figura 9. Níveis plasmáticos dos hormônios esteróides (testosterona, T; estradiol, E ₂ ; progesterona, P e a relação estradiol/testosterona, E ₂ :T) em tartaruga-da-Amazônia recém-eclodido. (*) Indica diferença significativa entre os sexos (teste Mann-Whitney, p<0,05).	14

Todos os direitos desse relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao **Laboratório de Morfologia Funcional (LMF/DM/ICB)**, ao **Laboratório de Animais Silvestres (LAS/FCA)** e ao **Projeto Pé-de-Pincha**. Parte desse relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos. Os autores permitem a cópia para este fim, desde que sejam diretamente solicitados. Os contatos são:

Prof. Dr. Wallice Paxiúba Duncan (wlpduncan@gmail.com)

Prof. Dr. Paulo César Machado Andrade (pcmandra@yahoo.com.br)

Acadêmica Tayanne da Silva Lopes (tayannelopes19@gmail.com)

Acesse www.lmf.ufam.edu.br para mais informações sobre este trabalho.

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi executado no Laboratório de Morfologia Funcional (LMF/UFAM) e Laboratório de Animais Silvestres (LAS/FCA) e se caracteriza como sub-projeto do projeto **“Manejo Sustentável de Quelônios por Comunidades do Médio Amazonas e Juruá – Pé-de-Pincha”** financiado pela **PETROBRAS AMBIENTAL**.

Nós agradecemos aos integrantes do **Projeto Pé-de-Pincha** (especialmente, à Sandra Helena, Joana, João Alfredo, Milla, “as Caróis”, Liriann e Natasha). Agradecemos também aos colegas do LMF (Aline, Regiane, Victória e Lene) pelas valiosas ajudas nas coletas e processamento do material biológico.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Métodos de sexagem em tartarugas

A determinação sexual é dependente da temperatura de incubação dos ovos na maioria dos répteis, incluindo as tartarugas (Wibbels et al., 1987), onde a formação sexual dos embriões ocorre durante o terço médio de incubação, conhecido como período termossensível (Malvasio et al., 2005). Identificar o sexo dos filhotes é importante para se conhecer a proporção entre machos e fêmeas da população e auxiliar tanto nos projetos de conservação da espécie quanto nas práticas de manejo e criação em cativeiro (Owens, 1997).

Estudos relacionados à proporção sexual têm sido de grande interesse em razão da preocupação dos possíveis efeitos que podem ocorrer devido às mudanças climáticas globais, os quais favorecem a feminilização da população nos cenários extremos previstos no Painel Intergovernamental para Mudanças Climáticas (Wibbels et al., 1993; Kamel & Mrosovsky, 2006). Entretanto, em recém-eclodidos e jovens o sexo não pode ser identificado com precisão; por isso, existem algumas metodologias para identificação sexual em tartarugas, no qual a escolha do processo de sexagem está relacionada à faixa etária do animal (Malvasio et al., 2002; Casale et al., 2006).

Alguns métodos de identificação sexual em filhotes foram desenvolvidos devido à necessidade em se conhecer o sexo de grandes números de animais (Larios, 1999). Porém, há grandes dificuldades na identificação sexual dos filhotes em razão dos métodos usados na sexagem serem complexos (Valenzuela et al., 2004). A metodologia mais utilizada na sexagem de neonatos é a análise visual da anatomia das gônadas. Esse exame leva em consideração características morfológicas distintas, tais como a cor, o tamanho, a vascularização e textura da gônada, bem como o tamanho e espessura do oviduto/ducto Mülleriano (Malvasio et al., 2012). Souza & Vogt (1994) utilizaram esta técnica em *Podocnemis unifilis* obtendo um nível de acerto de 80%. Esses autores afirmaram que o exame das gônadas utilizando apenas esteromicroscópio é o suficiente para identificação sexual. Porém, o grau de acerto está relacionado à experiência do examinador. Dependendo da espécie a ser estudada, os caracteres morfológicos citados acima podem variar. Isso significa dizer que a presença ou ausência de uma característica morfológica que ajuda a identificar o sexo numa dada espécie não pode ser generalizada para o grupo (Ceriani & Wyneken, 2008). Com isso, faz-se necessário o estabelecimento de critérios espécie-específicos, além de uma análise simultânea macro e microscópica das gônadas. Considerando isso, Yntema & Mrosovsky (1980) concluem ser necessária uma avaliação histológica para uma identificação sexual. Além disso, todos os demais métodos de sexagem precisam ser validados por meio de uma minuciosa análise histológica das gônadas (Larios, 1999; Xia et al., 2011; Malvasio et al., 2012).

De fato, a forma mais segura e definitiva de determinar o sexo de filhotes de tartarugas marinhas é através da dissecação e avaliação histológica das gônadas (Godfrey et al., 1997; Wibbels, 2003; Bonach et al., 2011). Para isso, é necessário a observação das características microscópicas peculiares para identificar o sexo, tais como a presença do epitélio germinativo nas gônadas femininas (ovários) e a formação de cordões testiculares nas gônadas masculinas, testículos (Ceriani & Wyneken, 2008). Nas tartarugas fêmeas jovens, o epitélio germinativo é constituído pelas oogônias ou ovócitos primordiais e células foliculares, enquanto

o estroma medular é formado pelo interstício e rico em vasos (Yazawa et al., 2015). Por outro lado, os testículos dos jovens ainda não possuem região luminal e são considerados como cordões seminíferos formados pelas células de Sertoli e gonócitos (Larios, 1999). As células de Sertoli sintetizam o hormônio anti-mülleriano que inibe o desenvolvimento do ducto mülleriano e evita a formação do oviduto. Já os gonócitos diferenciam-se em espermatogônias para formar futuramente os espermatozoides (Hutson et al., 2012). O desenvolvimento dos cordões medulares para túbulos seminíferos depende dSabe-se que essas características morfológicas estão presentes e já foram descritas para tracajá (*Podocnemis unifilis*) e tartaruga-da-Amazônia (*P. expansa*) (Malvasio et al., 2012). No entanto, os componentes gonadais não foram quantificados.

Métodos alternativos foram adotados, tais como a laparoscopia, um método não-letal no qual se observa a gônadas de cada animal ainda vivo (Wibbels, 1999). Porém, a principal desvantagem desse método é que se trata de um procedimento invasivo e potencialmente perigoso para o filhote. Além disso, requer treinamento cirúrgico prévio e alto custo operacional (Owens, 1999; Malvasio et al., 2012). Assim, devido às dificuldades em determinar o sexo de filhotes associado ao dilema conservacionista devido o sacrifício dos animais, tornou-se necessário a adoção de métodos pouco ou não invasivos para sexagem (Owens, 1997). Nesse contexto, uma variedade de metodologias de baixa letalidade vem sendo desenvolvidas, visando um método ideal que minimize o estresse do indivíduo (Owens et al., 1978; Wibbels et al., 1987). Um destes métodos sugere a dosagem de testosterona, estradiol e progesterona no sangue que tem a vantagem de ser menos invasivo e menos trabalhoso do que a histologia e a laparoscopia gonadal (Xia et al., 2011).

1.2 A espécie *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812)

Podocnemis é um gênero pertencente à família Podocnemididae popularmente conhecida como tartarugas de água doce, comum em rios da América do Sul. Das seis espécies do gênero supracitadas, *Podocnemis expansa*, a tartaruga-da-Amazônia é a maior espécie da América do Sul em proporções de tamanho. Esse quelônio possui a carapaça larga, achatada, lisa e uma coloração entre cinza a preto pesando em média 25 kg (Vogt, 2008; Andrade et al., 2012). A tartaruga-da-Amazônia é considerada em situação vulnerável de alto risco pela IUCN (2011), pois há um consumo indiscriminado desta espécie devido sua carne ser excelente fonte de proteína, bem como seus ovos, gordura e vísceras são de grande interesse para as comunidades ribeirinhas, somado a destruição e/ou ocupação do seu habitat (Smith, 1979; Martins & Molina, 2008). Em decorrência do declínio populacional da tartaruga-da-Amazônia, projetos voltados à preservação são cruciais para esta espécie, por isso conhecer a proporção entre machos e fêmeas é importante para a biologia da conservação e manejo em ambiente de cativeiro.

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 (Malvasio et al., 2012), porém como na maioria dos quelônios, as tartarugas-da-amazônia não mostram características sexuais dimórficos até a idade adulta. A maioria dos estudos sobre razão sexual nessa espécie foi realizado por meio da análise macroscópica das gônadas (Yntema, 1981). No entanto, os estudos de

Malvasio e colaboradores (2005; 2012) têm utilizado a análise histológica das gônadas para validar a sexagem visual nessa espécie. Informações recentes sobre a razão sexual dessa espécie na natureza têm demonstrado uma curva em favor das fêmeas. Dos 128 exemplares capturados entre os anos de 2004 a 2012 na Reserva Extrativista do Médio Juruá (Médio Rio Juruá, Amazônia Central), 89,1% foram fêmeas, 10,2% machos e 0,7% indeterminado (Andrade et al., 2012). No entanto, é importante enfatizar que esses dados são de animais com idade estimada variando de 0,6 a 30 anos. Em teoria, a razão sexual 1:1 é esperada, porém, para espécies cuja a determinação do sexo depende da temperatura, a proporção sexual de uma prole depende profundamente da temperatura no período sensível crítico durante a incubação de 58 dias (Bonach et al., 2011). Para esses autores, o período termossensível ocorre próximo do 40º dia de incubação. Nesse período, o sexo pode apresentar um padrão fêmea:macho:fêmea, ou seja, temperatura >27,5 °C nascem 80% fêmeas, 28-28,5 °C nascem 40-55% machos e >30 °C nascem 90% fêmeas. Esse padrão complexo deve ser levado em consideração durante os programas de manejo, pois o sexo de uma prole pode ser profundamente influenciado durante o transplante de covas. Com isso, o uso de ferramentas pouco letais para identificar o sexo nessa espécie pode ser uma alternativa para aumentar o esforço de amostragem evitando a eutanásia durante os protocolos de amostragens.

2. Hipóteses

H0: Não existem diferenças nos teores de hormônios esteróides entre os sexos de filhotes *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-Amazônia);

HA: Existem diferenças nos teores de hormônios esteróides entre os sexos de filhotes de *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-Amazônia);

H0: Não existem diferenças entre a sexagem visual realizada por examinadores distintos em filhotes de *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-Amazônia);

HA: Existem diferenças entre a sexagem visual realizada por examinadores distintos em filhotes de *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-Amazônia);

H0: Não existem diferenças entre a sexagem visual e hormonal em filhotes de *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-Amazônia);

HA: Existem diferenças entre a sexagem visual e hormonal em filhotes de *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-Amazônia);

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo

Identificação sexual por meio da análise hormonal, histológica e visual das gônadas de filhotes recém-eclodidos de tartaruga-da-Amazônia, *Podocnemis expansa*.

3.2 Objetivos específicos do projeto

- Análise dos hormônios: testosterona, progesterona e estradiol em filhotes de Tartaruga-da-Amazônia, *P. expansa*.
- Sexagem através da histologia das gônadas de filhotes recém-eclodidos de tartaruga-da-Amazônia, *P. expansa*.
- Identificação do sexo pela visualização de características morfológicas das gônadas de filhotes de tartaruga-da-Amazônia, *P. expansa*.

4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 Obtenção dos animais e visualização das gônadas

Quarenta e oito tartarugas-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*), recém eclodidos (Figura 1) foram cedidos pelo Projeto Pé-de-pincha. A autorização do ICMBio para o estudo foi liberada por meio da licença SISBIO Nº 19.323/2011. Os exemplares de tartaruga-da-Amazônia eram filhotes com tempo de vida em até dez dias, oriundos de tabuleiros naturais da localidade de Carauari/AM (04°52'S e 66°53'W) e de criadores do município de Iranduba/AM (03°17'S e 60°11'W). Os animais foram pesados na balança de precisão com as medidas descritas na (Tabela 1). As medidas da carapaça e do plastrão foram realizadas com o paquímetro de precisão de 0,1mm. Após as morfometrias, o sangue foi retirado e o plasma separado para análises dos hormônios esteróides. Seguida a obtenção das amostras de sangue, as tartarugas foram eutanasiadas utilizando baixa temperatura para induzir a hipotermia seguida de contusão cervical. A sexagem visual foi imediatamente realizada em estereomicroscópio (nome do aparelho). Após isso, o animal foi inteiramente fixado em (GTA 2,5% em tampão fosfato 10 mM, pH 7,3) para a preservação das características morfológicas antes do processamento histológico. 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 neonato de *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-Amazônia). Foto:WPD.

Tabela 2. Biometria (mm) dos animais utilizados nas análises: comprimento (comp) de carapaça, largura da carapaça, comprimento (comp) do plastrão, largura do plastrão e peso (g).

	Carapaça		Plastrão		
	Comp	Largura	Comp	Largura	Peso
Fêmeas	51,3±2,4	46±1,8	44,4±1,7	22,6±1,06	22±1,9
Machos	48,9±3,6	44,1±3,7	43,3±2,7	22,2±1,1	21,5±3,1

4.2 Coleta dos tecidos

Antes da eutanásia dos animais, amostras de sangue foram retiradas da veia femoral por meio de uma seringa de 1 ml previamente heparinizada (anticoagulante) e armazenado em local refrigerado. O tempo entre a coleta e a centrifugação não ultrapassou 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. Após a dissecação do animal em decúbito dorsal as análises visuais diretas das gônadas foram realizadas. O plastrão foi separado da carapaça tornando possível a visualização das gônadas.

4.3 Análises dos hormônios esteroides

Para a realização do ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e numeradas para identificação. Os hormônios: testosterona, progesterona e estradiol foram avaliados conforme metodologia abaixo descrita.

a) Testosterona: O kit DRG testosterona usado. O imunoensaio enzimático (ELISA) em fase sólida baseia-se no princípio de competição. Uma quantidade indeterminada de testosterona presente na amostra e uma quantidade fixa de

antígeno marcado com enzima competem pelos locais de ligação dos anticorpos que revestem os poços. Depois da incubação, os poços foram lavados para interromper a reação de competição. Após a reação do substrato, a intensidade da cor desenvolvida foi inversamente proporcional à quantidade de testosterona na amostra. Os resultados das amostras foram determinados diretamente usando a curva padrão.

b) Estradiol (E2): O kit DRG Estradiol contém uma enzima em fase sólida ELISA. Uma quantidade fixa de estradiol marcado com peroxidase compete com o estradiol presente nas amostras. O complexo E2-HRP-anticorpo torna-se fixado simultaneamente sobre as cavidades das placas de ELISA revestidas com excesso de IgG. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas com solução de parada. O cromóforo (TMB em tampão de substrato) foi adicionado e incubado durante 30 minutos. A reação foi parada com ácido sulfúrico e a absorbância será medida. A intensidade da coloração foi inversamente proporcional à concentração de E2 presentes na amostra original.

c) Progesterona: Foi utilizado o kit DRG 17 ALFA OH PROGESTERONA ELISA que é um ensaio imunoenzimático de fase sólida baseado no princípio de competição por sítios de ligação. As cavidades foram recobertas com anticorpo policlonal direcionado a um sítio antigênico da molécula de 17 ALFA OH PROGESTERONA. O 17 ALFA OH PROGESTERONA endógeno da amostra competirá pela ligação com 17 ALFA OH PROGESTERONA conjugado com peroxidase pela ligação ao anticorpo recoberto. Depois da incubação, o conjugado não ligado foi desprezado na lavagem. A quantidade de conjugado peroxidase ligado é inversamente proporcional à concentração de 17 ALFA OH PROGESTERONA na amostra. Depois da adição da solução de substrato, a intensidade de cor desenvolvida será inversamente proporcional à concentração de 17 ALFA OH PROGESTERONA na amostra.

4.4 Histologia e quantificação das estruturas gonadais

Após a sexagem visual, as gônadas foram cuidadosamente retiradas com tesoura de ponta fina e bisturi para, então, serem fixadas em glutaraldeído (GTA, 25%), tamponado (pH 7,3) e pós-fixadas em etanol 70%. As amostras foram desidratadas em gradiente de etanol (80% e 96%) e emblocadas em resina metacrilato. As secções (cortes) foram obtidas em 5µm e posteriormente o processo de coloração foi dado pela Hematoxilina de Carazzi contracorada com Eosina. Também foi utilizado o azul de toluidina (0,12%) contracorada com fucsina ácida. Adicionalmente, algumas lâminas foram coradas com a técnica PAS (ácido periódico e reagente de Schiff) e Alcian blue (AB, pH 2,5) para identificação de mucinas neutras e ácidas, respectivamente.

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 grides) com 196 intersecções (Figura 2) dependendo da estrutura avaliada. Os componentes gonadais quantificados nas fêmeas foram: região cortical e região medular, no qual na região cortical compreendia as oogônias e as células foliculares e a região medular, o interstício e vasos. Nos neonatos do sexo masculino contabilizamos os cordões seminíferos e interstício. No interior dos cordões seminíferos foram analisadas as células de Sertoli e as espermatogônias e no interstício os vasos.

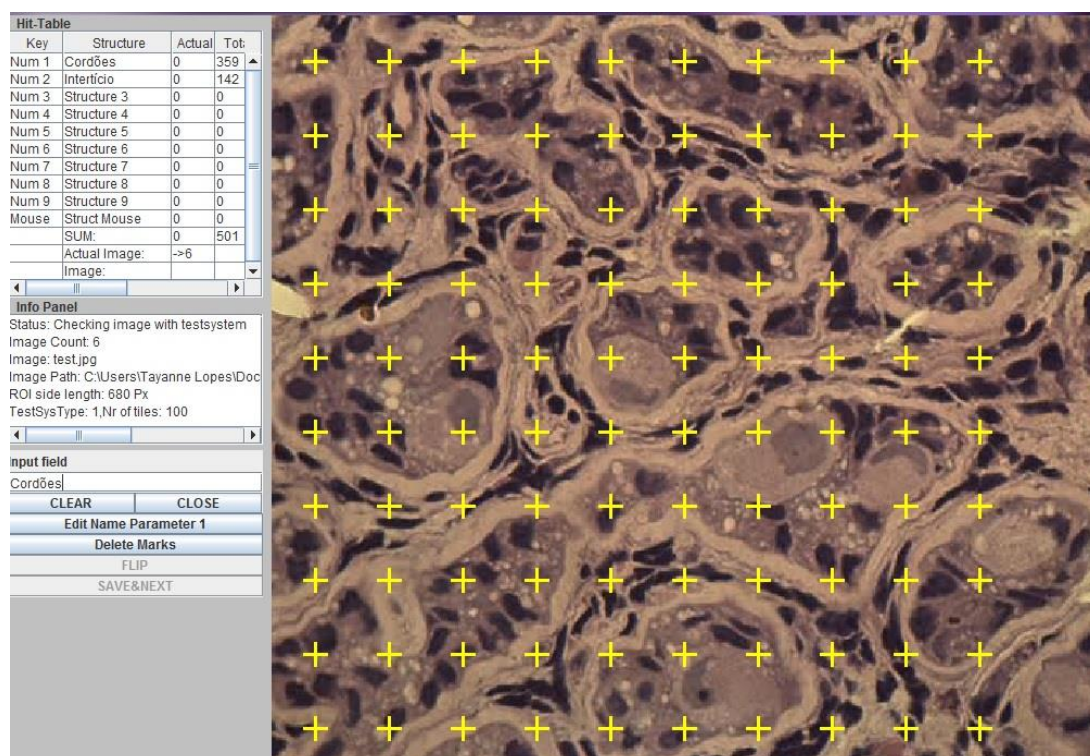


Figura 2. Exemplo de um sistema de intersecções (sondas estereológicas) do software Stepanizer sobrepostas em uma imagem digitalizadas da histologia do testículo de um neonato de *P. expansa*. A densidade de volume (dv, %) dos componentes gonadais foi quantificada como sendo o percentual das estruturas presentes na imagem projetada.

4.5 Análises macroscópicas

As análises macroscópicas foram realizadas após a dissecação do animal em decúbito dorsal. O plastrão foi separado da carapaça com auxílio de uma tesoura e tornando possível a visualização das gônadas. A sexagem foi realizada conforme os critérios descritos por Malvasio et al. (2002). Esses autores sugerem 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. Nesse estudo, a sexagem foi realizada por meio de um observador pouco experiente (LMF, integrante do Laboratório de Morfologia Funcional) e outro mais experiente (LAS, integrante do Laboratório de Animais Silvestres). Após a identificação sexual, imagens 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.

4.6 Análises estatísticas

Os dados estão apresentados como média e erro padrão da amostra. O teste de normalidade de normalidade foi utilizado a priori. Análise de regressão logística foi usada para verificar as relações entre os dados hormonais e a sexagem visual (macho/fêmea) ou a sexagem histológica (pela presença do ovário ou testículo, caracterizando fêmea ou macho, respectivamente). Análises de correlações e de regressão linear foram utilizadas para se verificar as associações entre todas variáveis contínuas analisadas. Comparações dos níveis hormonais entre ambos os sexos foram realizados por meio do teste Mann-Whitney. Em todos os casos, o nível de significância aceito foi de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Sexagem visual e anatomia das gônadas

Macroscopicamente as gônadas femininas possuem um aspecto granular, coloração translúcida e alongados ultrapassando a extensão dos rins em ambas as extremidades. O oviduto é bem desenvolvido e visível em todos os indivíduos analisados (Figura 3A). Por outro lado, os testículos nos machos possuem um aspecto liso com coloração esbranquiçada circundada por um tecido de cor preta. O ducto mülleriano é residual e pouco desenvolvido (Figura 3B).

Esses mesmos critérios foram utilizados para realizar sexagem visual, macroscópica ou anatômica. Ainda que realizada por dois observadores independentes (LMF, Laboratório de Morfologia Funcional *versus* LAS, Laboratório de Animais Silvestres) os resultados foram são semelhantes ($p < 0,05$; $X^2 = 4,50$), porém o coeficiente de correlação de Spearman foi considerado baixo ($r^2 = 0,34$). Como esperado, o observador mais experiente apresenta maior grau de acerto (84,4 %). Se comparada à sexagem histológica (forma mais precisa de identificação do sexo em tartarugas), a sexagem visual realizada pelo observador do LAS apresenta elevado coeficiente de correlação de Spearman ($r^2 = 0,635$). Essa associação é altamente significativa ($p < 0,001$). O observador menos experiente do LMF apresentou menor grau de acerto (72,2 %) e um baixo coeficiente de correlação (0,386) com as análises histológicas.

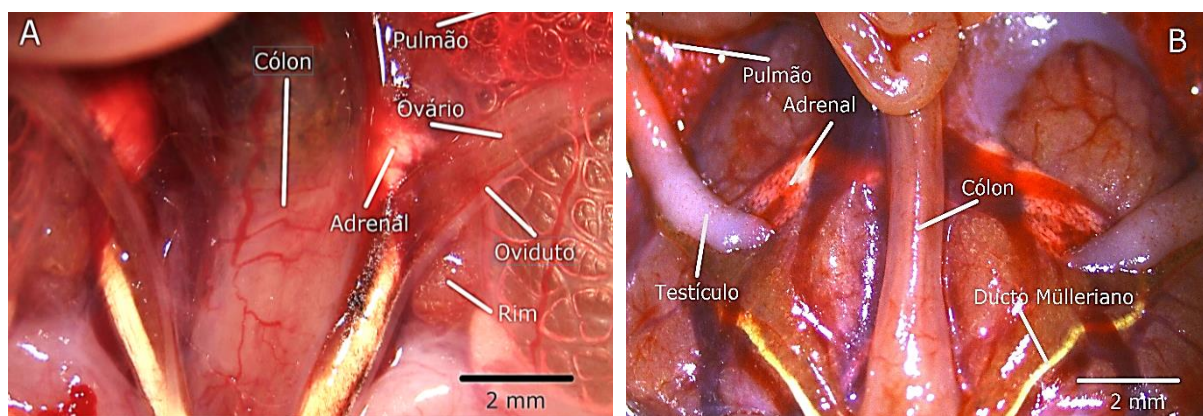


Figura 3. Visualização macroscópica (anatômica) das gônadas de uma fêmea (A) e um macho (B) recém-eclodidos de *Podocnemis expansa* durante a sexagem. Foto: PCMA.

5.2 Sexagem histológica e Morfometria das gônadas

Dos 48 indivíduos analisados, 33 foram identificados histologicamente como machos e 15 como fêmeas. Assim sendo, a razão fêmea:macho foi apenas de 0,45. Nas gônadas femininas, o ovário e o oviduto são bem visíveis (Figura 4A). Histologicamente, verifica-se no interior do ovário duas regiões distintas: o epitélio germinativo e o estroma medular (Figura 4B). Já o oviduto apresenta uma região luminal revestido por um epitélio colunar simples (Figura 4C). Na região cortical do ovário (correspondente ao epitélio germinativo) encontram-se as oogônias formando folículos ovarianos primordiais (Figura 4D).

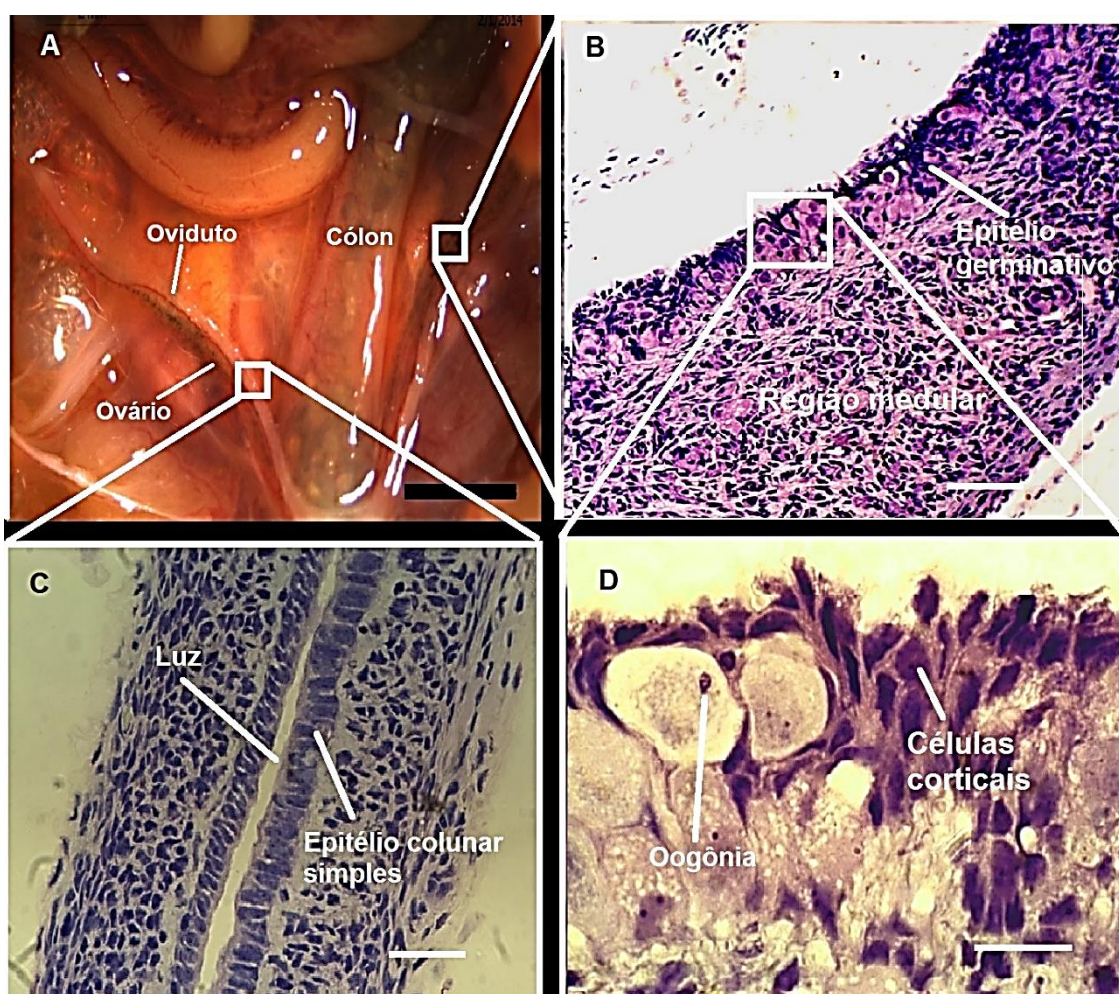


Figura 4. Cavidade visceral de uma fêmea evidenciando ovários e oviduto (A). Detalhes histológicos do epitélio germinativo e região medular (B). Observa-se ainda detalhes das células colunares altas que revestem a luz do oviduto (C). As oogônias e células foliculares podem ser observadas na região cortical (D). As escalas correspondem: (A) 2 mm, (B) 100 μ m, (C) 50 μ m, (D) 10 μ m.

Nas análises dos componentes gonadais das fêmeas, o epitélio germinativo corresponde a 30,7% do ovário, enquanto o estroma medular compreende 69,3% das estruturas observadas nesse órgão (Figura 5B). Se considerarmos apenas o epitélio germinativo: 77,9% são células foliculares e 22,1% são ocupados por oogônias (Figura 5C). A região medular apresenta uma baixa densidade de vasos (<5% das estruturas presentes no estroma medular) (Figura 5D).

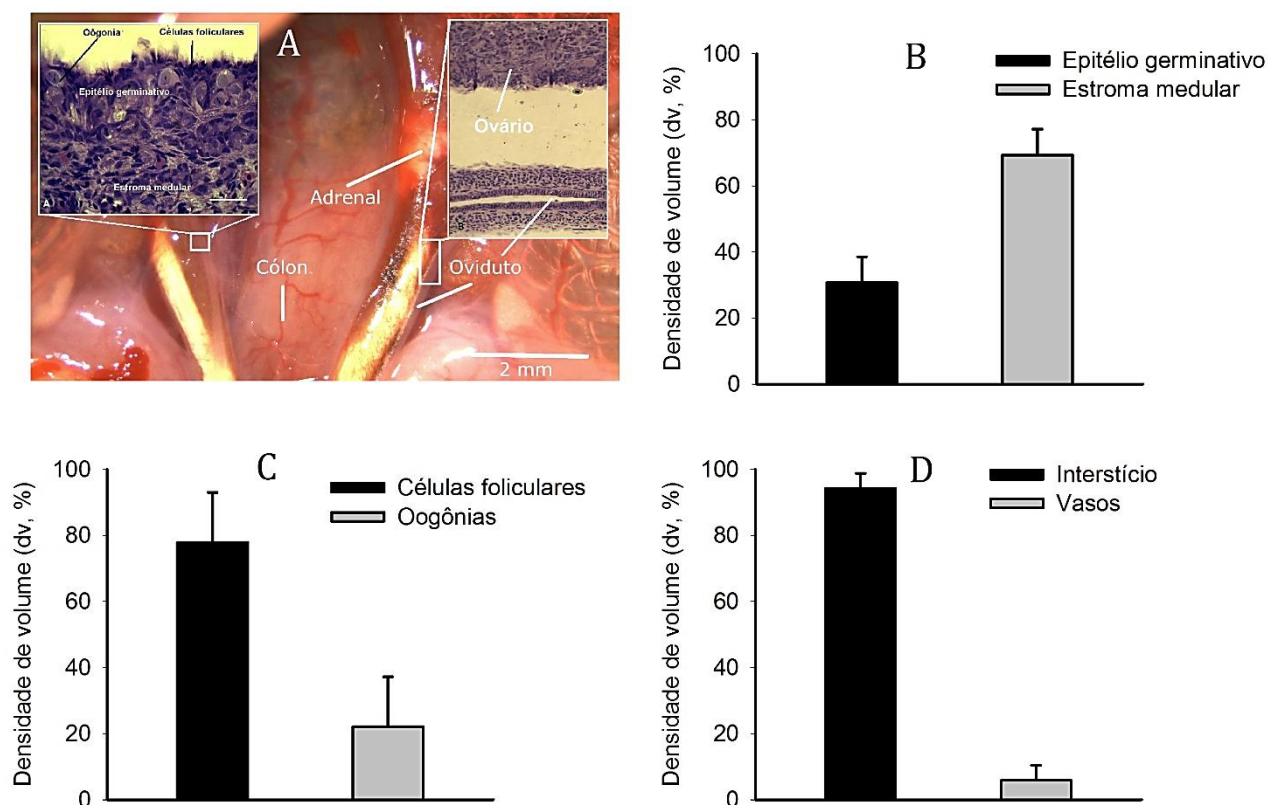


Figura 5. Anatomia e histologia de um ovário e oviduto (A). Proporção relativa de tecido epitelial germinativo e região medular (B), células foliculares e oogônias no epitélio germinativo (C) e densidade de vasos no estroma medular, interstício (D).

Nos machos a caracterização histológica revela que nos testículos (6A) observam-se estruturas tubulares denominadas de cordões seminíferos (6B). Nessa estrutura não existe região luminal. O ducto mülleriano é residual possui a luz reduzida (6C). As células de Sertoli e os gonócitos possuem vacuolizações citoplasmáticas (estruturas esbranquiçadas no interior dos cordões seminíferos) observadas na Figura 6B). Tanto as células de Sertoli quanto os gonócitos formam o epitélio germinativo, o qual está envolvido pelas células mióides peritubulares.

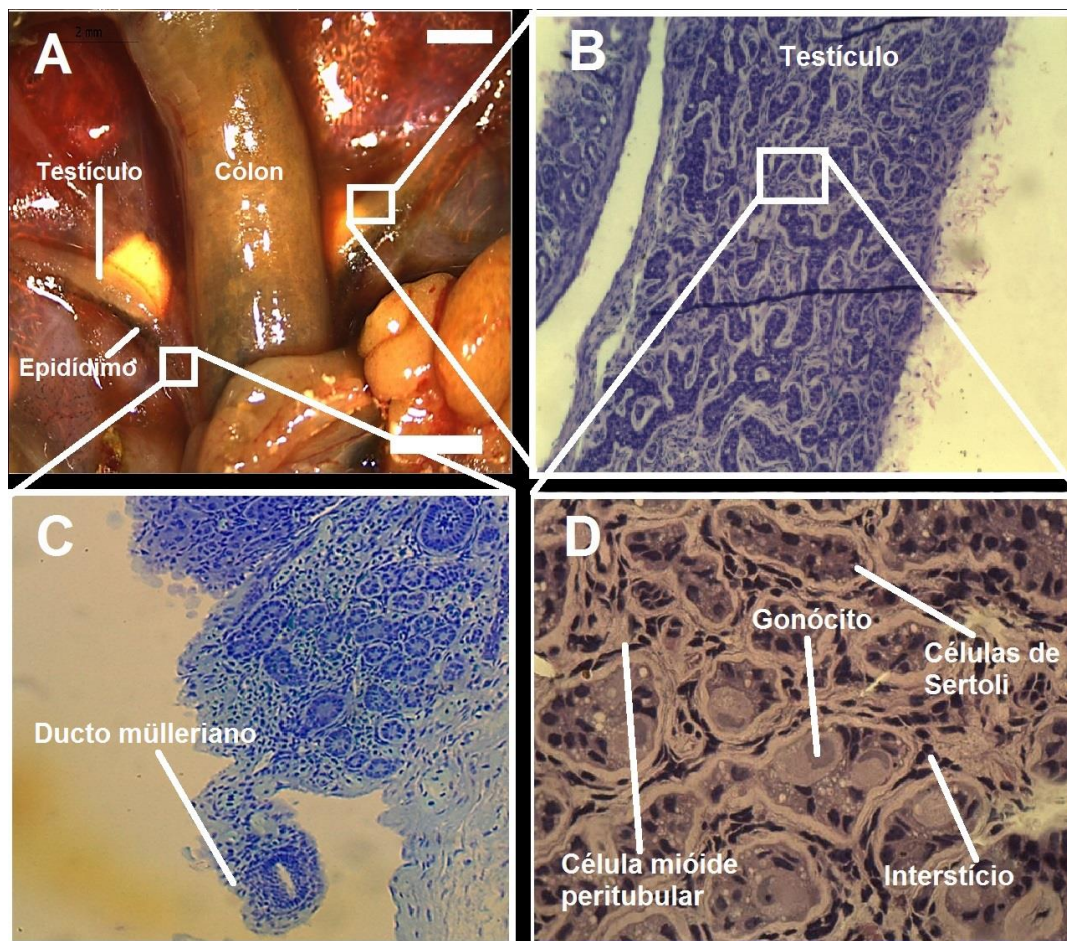


Figura 6. A) Cavidade visceral de neonato macho de tartaruga mostrando os testículos e o ducto Mülleriano residual (A). Histologia do testículo mostrando a presença de cordões medulares (cordões seminíferos) (B). Fotomicrografia do ducto Mülleriano residual (C). Detalhes dos cordões seminíferos mostrando as células de Sertoli e gonócitos com vacuolizações citoplasmáticas, células mióides peritubulares e a região intersticial (D). As escalas correspondem: (A) 2 mm, (B) 100 μ m, (C) 100 μ m, (D) 20 μ m.

Os cordões seminíferos representam mais de 64% das estruturas presentes no interior dos testículos (Figura 7B). As células de Sertoli são as mais numerosas (>85%) que os gonócitos (7C). Na região intersticial, os vasos ocupam menos de 5% dos componentes estruturais. Os dados de vascularização são proporcionalmente semelhantes aos valores encontrados para as fêmeas.

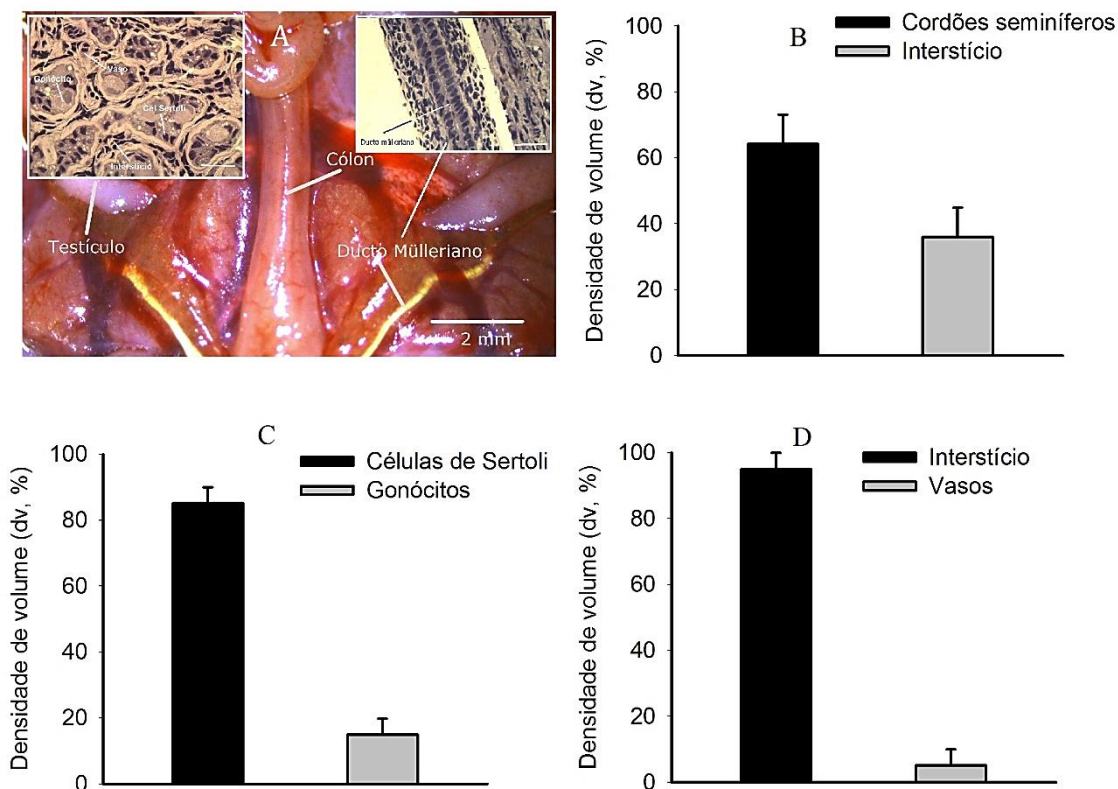


Figura 7. Anatomia e detalhe histológico do testículo e ducto Mülleriano residual de um filhote macho de tartaruga (A). Proporção relativa de cordões seminíferos e de interstício no testículo (B). Considerando apenas o epitélio germinativo, a densidade de volume das células de Sertoli e gonócitos (C). Proporção de tecido vascular no interior do interstício (D).

5.3 Relações entre as estruturas gonadais e os níveis dos hormônios esteróides plasmáticos

Nos recém-eclodidos identificados como fêmeas, a produção de estradiol (E_2) (Figura 8A) e a relação $E_2:T$ (estradiol:testosterona) estão positivamente associadas à região medular (Figura 8B e 8D). Obviamente, o inverso é verdadeiro para o epitélio germinativo (Figura 8A e 8C). Os teores de progesterona estão positivamente relacionados à vascularização gonadal (Figura 8E) e negativamente associados à região do interstício (Figura 8F). Nenhuma associação entre morfometria gonadal e hormônios esteróides plasmáticos foi nos filhotes machos de tartaruga-da-Amazônia.

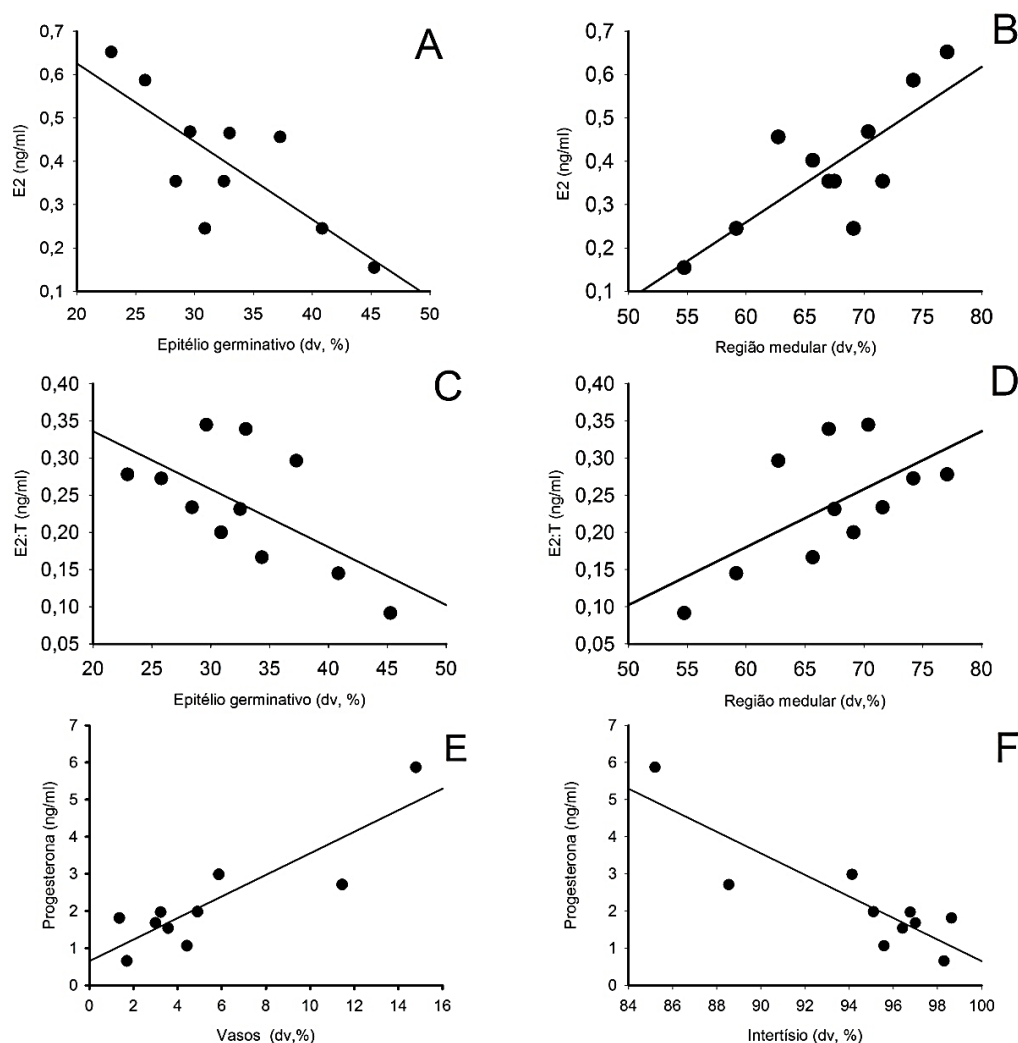


Figura 8. Relações entre as estruturas gonadais e os níveis de hormônios esteróides em filhotes fêmeas de tartaruga.

5.4 Hormônios esteróides e sexagem hormonal

Em todos os animais analisados, os níveis encontrados de testosterona (T), estradiol (E₂) e progesterona no plasma foram $2,1 \pm 0,2$; $0,17 \pm 0,02$; $1,4 \pm 0,18$ ng/ml, respectivamente. A relação E₂:T foi de $0,08 \pm 0,01$. Os machos apresentaram teores maiores de testosterona ($2,6 \pm 1,1$ ng/ml) comparados aos níveis encontrados em fêmeas ($1,6 \pm 0,3$ ng/ml). Por outro lado, as fêmeas apresentam valores de estradiol ($0,38 \pm 0,15$ ng/ml), enquanto os teores E₂ nos machos foram apenas $0,09 \pm 0,02$ ng/ml (Figura 9). Nós observamos que os valores de testosterona não estão relacionados aos níveis E₂. Baseando-se nos limites (inferiores e superiores) do intervalo de confiança dos dados da relação E₂:T, foram separados indivíduos do sexo masculinos e femininos. Com isso, foram criados dados categóricos (macho/fêmea) para cada indivíduo (sexagem hormonal). Os dados de sexagem hormonal foram relacionados com a sexagem histológica. A análise de regressão logística revelou uma associação de 96,6 % entre a sexagem hormonal e a histológica ($p < 0,05$).

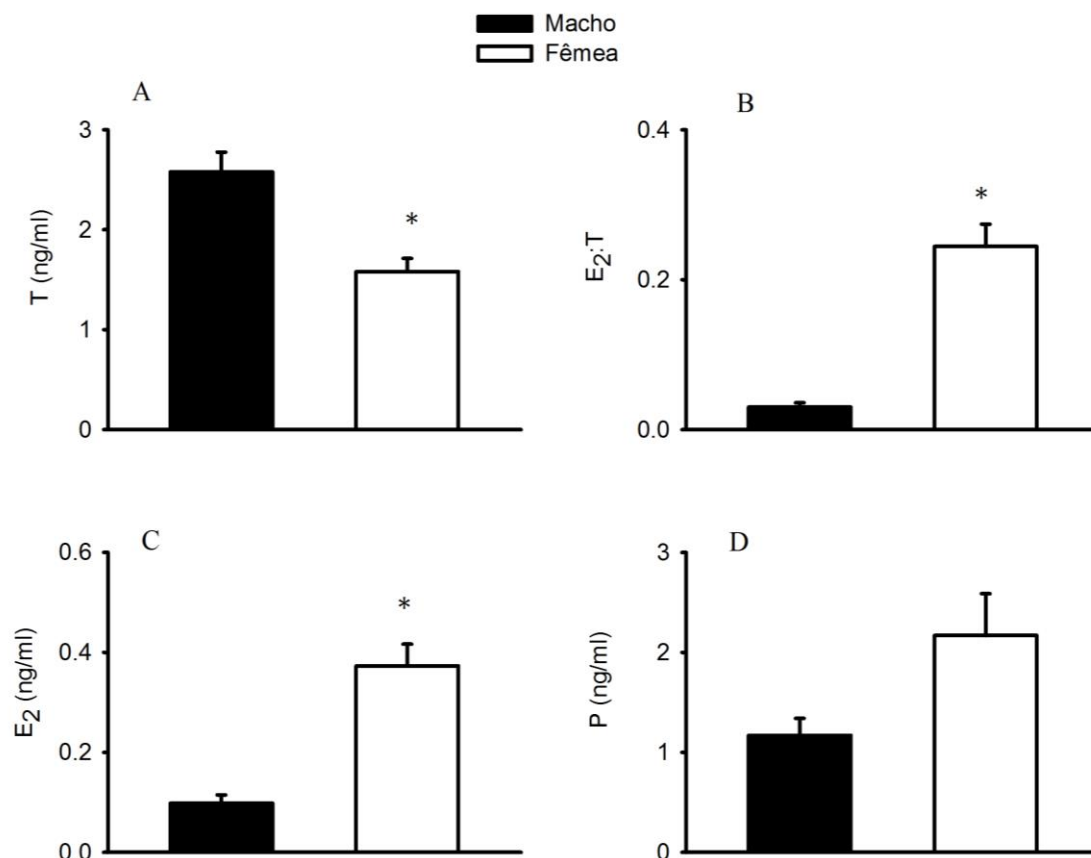


Figura 9. Níveis plasmáticos dos hormônios esteróides (testosterona, T; estradiol, E₂; progesterona, P e a relação estradiol/testosterona, E₂:T) em tartaruga-da-Amazônia recém-eclodido. (*) Indica diferença significativa entre os sexos (teste Mann-Whitney, $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

6.1 Sexagem e anatomia das gônadas

Diferente dos adultos, nos filhotes de tartarugas não é possível distinguir os machos das fêmeas pelas características externas do corpo. Em geral, isso requer o uso de metodologias letais para identificar o sexo de cada animal (Malvasio et al., 2012). O inconveniente deste método é o sacrifício de vários animais para estudos de proporção sexual (Owens, 1997). No entanto, a visualização direta das gônadas é ainda o método mais comum e fácil de sexagem entre os herpetologistas (Vogt, 1994). Se comparado ao método histológico (que é o mais preciso) o grau de acerto é relativamente elevado, pois, na maioria dos casos está em torno dos 80% (Malvasio et al., 2012).

Os erros mais comuns são: (i) inexperiência do pesquisador, (ii) uso de critérios e estruturas anatômicas recomendadas para outras espécies, (iii) grau de desenvolvimento gonadal do filhote, (iv) idade ou (v) a associação desses fatores. De fato, a experiência do observador ajuda a eliminar uma série de variáveis que podem comprometer a análise. Em nosso estudo, isso ficou evidente, pois o observador mais experiente do Laboratório de Animais Silvestre da UFAM

apresentou maior grau de acerto (~85%). Um observador inexperiente ou não familiarizado com os componentes anatômicos da espécie pode encontrar dificuldades para distinguir os sexos devido às semelhanças entre as gônadas, principalmente se o órgão apresentar-se pouco desenvolvido. Em certos casos é difícil distinguir facilmente um filhote macho de uma fêmea. Em geral, o trato reprodutivo de uma fêmea neonato consiste de ovários pares, oviduto (também conhecido como ducto Mülleriano) e ligamentos suspensórios ou mesentérios (mesovarium, mesoalpinx e mesotubarium). Enquanto nos machos juvenis, os testículos são pares, assim como os ductos Mülleriano são residuais (Larios, 1999). Descritivamente, a gônada masculina apresenta uma textura lisa e coloração esbranquiçada, enquanto as fêmeas foram registradas gônadas que a coloração é translúcida e altamente vascularizada. Essas características anatômicas são semelhantes as descritas para filhotes de *Chelonia mydas* (Ceriani & Wyneken, 2008; Xia et al., 2011), *Caretta caretta*, *Dermochelys coriacea* (Ceriani & Wyneken, 2008) e *Trachemys dorbignyi* (Malvasio et al., 2012). A semelhança morfológica sugere que esses traços são bem conservados evolutivamente.

Durante a sexagem visual, a vascularização da gônada é normalmente um critério utilizado. Nas análises estereológicas, nós observamos que a densidade de vasos nos ovários e testículos é semelhante. Isso significa que a vascularização gonadal pode não ser um critério preciso para identificar o sexo dos recém-eclodidos de tartaruga-da-Amazônia. Outra dificuldade está associada ao grau de desenvolvimento gonadal. Por exemplo, uma ninhada de filhotes de *Caretta caretta*, *Dermochelys coriacea* e *Chelonia mydas* apresentam grandes variações no grau de desenvolvimento gonadal dificultando a identificação do sexo nesses neonatos (Ceriani & Wyneken, 2008). O mesmo problema pôde ser observado nas gônadas dos filhotes de tartarugas-da-Amazônia. Ainda que todos os filhotes tenham idade semelhante, alguns indivíduos apresentam as gônadas bem desenvolvidas (machos com cordões seminíferos bem visíveis e fêmeas com epitélio germinativo com oogônias ou estruturas foliculares), enquanto outras com as gônadas semelhantes àquelas bipotenciais (descritas para a fase embrionária).

6.2 Identificação histológica das gônadas

Neste estudo a análise histológica gonadal foi utilizada para determinação sexual. Essa avaliação é considerada por muitos autores como o método mais seguro para identificação sexual em tartarugas (Mrosovsky & Godfrey, 1995; Larios, 1999). Isso se deve às características morfológicas peculiares a cada sexo. Por exemplo, nos machos o epitélio que reveste a gônada é achatado e separado dos cordões medulares (ou seminíferos). Nas fêmeas, o epitélio superficial é espesso e a região medular tem aspecto desorganizado ou apresenta cordões medulares vestigiais (Larios, 1999). A histologia das gônadas dos filhotes de tartaruga-da-Amazônia revela características semelhantes aquelas descritas para neonatos de tartarugas-marinhas, *Caretta caretta*, *Dermochelys coriacea*, *Chelonia mydas* (Ceriani & Wyneken, 2008) e *Lepidochelys olivacea* (Larios, 1999). Além disso, corrobora as descrições microscópicas feitas por Malvasio et al. (2012) para filhotes de tracajá (*Podocnemis unifilis*) e tartaruga-da-Amazônia (*P. expansa*). No entanto, diferente dos autores supracitados, nosso estudo descreve e quantifica (densidade de volume, %) cada componente gonadal.

Os machos neonatos da tartaruga-da-Amazônia possuem epitélio que recobre os testículos do tipo monoestratificado, semelhante ao pavimentoso

simples descrito por Malvasio et al. (2012) para essa mesma espécie. No interior da gônada visualizam-se os cordões medulares (ou seminíferos) revestidos por células mióides peritubulares. Tal como em mamíferos (Wilhelm et al., 2007), essas células formam uma camada que circunda células de Sertoli e as células germinativas. Nos adultos, o papel das células mióides peritubulares está associado à redução da região luminal dos túbulos seminíferos auxiliando na saída dos espermatozoides dos testículos. Nos filhotes de tartaruga-da-Amazônia as células de Sertoli são mais numerosas (>80% das células presentes nos cordões seminíferos) que os gonócitos (células germinativas, possivelmente espermatogônias). Esses resultados são diferentes de Malvasio et al. (2012). Tais autores relataram que as células de Sertoli são raras. É provável que esses autores possam ter confundido células de Sertoli com gonócitos. As células de Sertoli têm núcleo oval e fortemente basofílico. Além disso, tem papel crítico no início da diferenciação gonadal, pois agem como centro organizador para formar os cordões testiculares a partir da gônada ambissexual (Wilhelm et al., 2007). Essa célula origina-se a partir do epitélio celômico (Yao et al., 2004) e sintetiza o hormônio anti-Mülleriano impedindo o desenvolvimento do ducto Mülleriano nos machos (Hutson et al., 2012). Por outro lado, os raros gonócitos dos filhotes de tartarugas-da-Amazônia têm núcleo globoso e fracamente basofílico. Raras células germinativas também foram relatadas para *L. olivacea* (Larios, 1999). Em nosso estudo, os gonócitos de tartarugas-da-Amazônia podem ser encontrados tanto na região central quanto na periferia dos cordões seminíferos. Essa observação é consistente com aquela descrita por Malvasio et al. (2012), tanto para tartaruga-da-Amazônia quanto para tracajá (*P. unifilis*). Esses autores relatam que as espermatogônias estão aderidas ao epitélio seminífero. Em mamíferos, os gonócitos fetais ou neonatais também estão localizados na região dos cordões espermáticos, porém, na infância migram para a periferia entre as células de Sertoli (Hutson et al., 2012). Nos cordões seminíferos dos filhotes de tartarugas-da-Amazônia numerosas vesículas lipídicas (vacuolizações) podem ser encontradas tanto nas células de Sertoli quanto nos gonócitos. Tais estruturas também foram observadas nos exemplares filhotes de *P. unifilis* e *P. expansa* analisados por Malvasio et al. (2012). No caso dos gonócitos, essa característica é semelhante àquela observada nas espermatogônias A-escuro dos mamíferos (Hutson et al., 2012). Na região intersticial do testículo de tartaruga-da-Amazônia podem ser encontrados números fibroblastos, células intersticiais e infiltrados, tais como heterófilos.

Nos filhotes fêmeas de tartaruga-da-Amazônia, os ovários se diferenciam dos testículos pela espessura do epitélio e pela região do estroma pouco organizado. As células que formam o epitélio têm aspectos colunares. Os folículos ovarianos apresentam típicas oogônias semelhantes aquelas descritas por Malvasio et al. (2012) para filhotes de *P. unifilis* e *P. expansa*. Durante o período sensível crítico à temperatura, se as gônadas bipotencial começam a se diferenciar em ovários, os cordões medulares começam a se desagregar e rearranja-se para formar as lacunas circulares, enquanto as células germinativas começam a se proliferar na região cortical (Barske & Capel, 2010).

Em todos os vertebrados, os ovários têm duas funções importantes: (i) produção de esteróides e, (ii) formação de células germinativas. A unidade básica do ovário é o folículo ovariano. Nos adultos está circundado pelas células granulosas e tecais. As oogônias de tartaruga-da-Amazônia são células grandes

com núcleos proeminentes com basofilia fraca e apresentando de 1 a 2 nucléolos visíveis. No citoplasma também se observam numerosas vesículas lipídicas (vacuolizações). As células corticais possuem basofilia acentuada e núcleos alongados. Essas células juntamente com as oogônias estão aderidas à uma membrana basal que claramente separa o córtex do estroma medular. Diferente dos machos, os cordões medulares das fêmeas de tartaruga-da-Amazônia estão ausentes ou são vestigiais naqueles indivíduos com pouca diferenciação gonadal. Essa característica é semelhante à descrita para *L. olivacea* (Larios, 1999), *Emys orbicularis*, *L. olivacea* e *D. coriacea* (Pieau & Dorizzi, 2004). Mas também mostra profundas semelhanças com a histologia ovariana de mamíferos embriões e/ou neonatos (Wilhelm et al., 2007).

Em répteis, o desenvolvimento do córtex ovariano é controlado pelos estrógenos. As células da teca produzem os andrógenos, enquanto as células da granulosa sintetizam estrógenos a partir dos andrógenos (Yazawa et al., 2015). Em nosso estudo, os níveis de estradiol estão associados ao volume do estroma medular ovariano de tartaruga-da-Amazônia. É provável que na fase inicial do desenvolvimento gonadal dessa espécie a síntese do estradiol possa ocorrer na medula ovariana. Nos vertebrados machos adultos, as células de Leydig localizadas na região intersticial dos testículos são responsáveis pela produção de testosterona (Hutson et al., 2012). Porém, em vários vertebrados, as células de Sertoli podem converter androstenediona em testosterona durante a vida fetal (Yazawa et al., 2015). No entanto, a presença da enzima aromatase nas células de Leydig de *Chelonia mydas* imaturos sugere que essa célula também pode estar envolvida na produção de estrógenos a partir de testosterona (Otsuka et al., 2008). Essas diferentes fontes celulares de hormônios esteróides podem explicar a variabilidade hormonal observada entre indivíduos neonatos do mesmo sexo ou entre indivíduos cuja sexagem hormonal não foi resolutive para a tartaruga-da-Amazônia. Além disso, a ausência de qualquer relação entre os hormônios esteróides (testosterona, progesterona e estradiol) com as estruturas testiculares estudadas nessa espécie sugere que outras fontes extra-gonadais, tais como as glândulas adrenais possam ter papel relevante na síntese desses hormônios.

6.3 Níveis hormonais

Devido às dificuldades de identificação do sexo por meio da anatomia da gônada, além do dilema conservacionista devido a morte do animal, diversas técnicas alternativas para sexagem foram testadas. Algumas consideradas pouco invasivas, tais como a mensuração diária da temperatura dos ninhos (Wibbels, 2003), identificação por meio dos antígenos H-Y (Owens, 2000), laparoscopia (Vogt, 1994) e marcadores genéticos ou epigenéticos (Hernández-Echeagaray et al., 2012). No entanto, muitos desses métodos falharam em identificar o sexo. Por exemplo, o uso de marcadores genéticos ou epigenéticos não foi resolutive para avaliar a razão sexual em *L. olivacea* (Hernández-Echeagaray et al., 2012). A laparoscopia requer cautela para analisar indivíduos pequenos, em alguns casos devem ser usados apenas em indivíduos >100 g (Larios, 1999). Por outro lado, a análise hormonal baseada nos níveis de esteróides plasmáticos tem se mostrado uma ferramenta promissora para identificação do sexo (Larios, 1999; Xia et al., 2011).

Vários autores recomendam que os perfis dos hormônios esteróides dos recém-eclodidos de uma dada espécie sejam previamente estudados, e suas relações com o sexo também devem ser substancialmente bem estabelecidos, antes de usar a dosagem hormonal como critério para sexagem (Larios, 1999; Eckert, 1999). Para isso, nós descrevemos aqui pela primeira vez os teores de testosterona (T) ($3,07 \pm 1,2$ ng/ml), progesterona ($1,34 \pm 0,11$ ng/ml) e estradiol (E₂) ($0,17 \pm 0,16$ ng/ml) para a tartaruga-da-Amazônia. As fêmeas possuem baixos níveis de testosterona e elevados níveis de E₂ em relação aos machos. Com esses dados, nós observamos que a relação E₂:T foi 2,9 vezes maior nas fêmeas que nos machos. Baseado nos limites inferiores e superiores do intervalo de confiança dessa relação, nós diferenciamos as tartarugas fêmeas dos machos. Em *Chelonia mydas*, uma espécie de tartaruga marinha, a razão E₂:T foi cerca de 2,5 vezes maior nas fêmeas que nos machos (Xiu et al., 2011). Nessa espécie os níveis de testosterona foram de $0,186 \pm 0,05$ ng/ml nos machos e $0,105 \pm 0,03$ ng/ml nas fêmeas, enquanto os teores de estradiol foram de $0,132 \pm 0,03$ ng/ml nos machos e $0,205 \pm 0,05$ ng/ml nas fêmeas. Em um estudo similar realizado com *Caretta caretta*, a relação E₂:T foi 3,3 vezes maior nas fêmeas que nos machos (Gross et al., 1995). Segundo esses autores, esses dados permitiram separar indivíduos machos de fêmeas. É importante enfatizar que a análise hormonal feita nessas espécies marinhas foi realizada por meio da técnica de radioimunoensaio. Em nosso estudo, os hormônios esteróides da tartaruga-da-Amazônia (*P. expansa*) foram quantificados pelo do método Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Isso pode parcialmente explicar as diferenças dos valores entre essas espécies. Outra explicação possível pode estar associada às diferenças espécie-específica. Por exemplo, em *Lepidochelys kempii*, outra espécie marinha, os níveis de testosterona nos machos foram 0,09 ng/ml (Owens, 1997). Esse valor é 2 vezes menor que os valores relatados para *Caretta caretta*, conforme Gross et al. (1995). O método ELISA tem se mostrado bastante eficiente e resolutivo. Como reportado anteriormente, a sexagem baseada na razão E₂:T demonstrou elevada correspondência com a sexagem histológica e visual. Em *Podocnemis expansa* a congruência da análise hormonal com sexagem histológica foi de 96,6%. Resultados semelhantes foram obtidos para *Chelonia mydas* (Xia et al. (2011) e *Caretta caretta* (Gross et al., 1995) entre os indivíduos de sexados hormonalmente e a histologia das gônadas. Se considerarmos que a dosagem hormonal utiliza apenas uma pequena amostra de sangue do animal, o protocolo de sexagem hormonal, por ser de baixa letalidade, poderá melhorar as estimativas da razão sexual dos filhotes quelônios nos tabuleiros da bacia Amazônica, sem a necessidade de abater o animal. Com esses dados, a avaliação pelos hormônios esteróides consolida-se como uma ferramenta promissora para sexagem de uma grande quantidade de indivíduos dentro uma ninhada ou população.

Informações sobre a razão sexual dos filhotes em uma ninhada é fundamental para os estudos populacionais. Em geral, em populações naturais espera-se que a proporção de machos:fêmeas seja de 1:1. No entanto, nos quelônios, a determinação do sexo é dependente da temperatura. Com isso, o manejo dos ninhos pode afetar o sexo do embrião e alterar a razão sexual da prole. Mudanças na razão sexual pode em teoria afetar a dinâmica populacional em poucas gerações. Em situações de cativeiro, o manejo dos ovos para desviar a razão sexual em favor de mais fêmeas pode ser desejável. Para o setor produtivo, as

fêmeas são valiosas devido ao seu tamanho e produzem ovos. Enquanto os poucos machos podem inseminar várias fêmeas.

7. CONCLUSÕES

- Durante a sexagem anatômica (macroscópica ou visual, por meio de um estereomicroscópio) de tartaruga-da-Amazônia, um observador experiente demonstra um grau de acerto ~85%. Por outro lado, um observador inexperiente ou não familiarizado com os componentes anatômicos da espécie encontra dificuldades para distinguir os sexos devido às semelhanças entre as gônadas e acerta ~75% da sexagem;
- Nas análises estereológicas, nós observamos que a densidade de vasos nos ovários e testículos é semelhante. Isso significa que a vascularização da gônada pode não ser um critério preciso para identificar o sexo dos recém-eclodidos de tartaruga-da-Amazônia;
- Nos filhotes de tartaruga-da-Amazônia as células de Sertoli são mais numerosas (>80% das células presentes nos cordões seminíferos) que os gonócitos (células germinativas, possivelmente espermatogônias);
- Em nosso estudo, os gonócitos de tartarugas-da-Amazônia podem ser encontrados tanto na região central quanto na periferia dos cordões seminíferos;
- Nos cordões seminíferos dos filhotes de tartarugas-da-Amazônia numerosas vesículas lipídicas (vacuolizações) podem ser encontradas tanto nas células de Sertoli quanto nos gonócitos;
- Nos filhotes fêmeas de tartaruga-da-Amazônia, os ovários se diferenciam dos testículos pela espessura do epitélio e pela região do estroma pouco organizado;
- Nós observamos que a relação E₂:T (estradiol:testosterona) foi 2,9 vezes maior nas fêmeas que nos machos. Essa razão permitiu diferenciar fêmeas de machos. As fêmeas possuem níveis de testosterona baixos em relação aos machos;
- Os dados de sexagem hormonal foram relacionados com a sexagem histológica. A análise de regressão logística revelou uma associação de 96,6 % entre a sexagem hormonal e a histológica.

8. 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.

Barske L. A. & Capel B. (2010). Estrogen represses SOX9 during sex determination in the red-eared slider turtle *Trachemys scripta*. *Developmental Biology*, 341: 305–314.

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.

Casale, P.; Lazar, B.; Pont, S.; Tomás, J.; Zizzo, N.; Alegre, F.; Badillo, J.; Di Summa, A.; Freggi, D. & Lackovi, G. (2006). Sex ratios of juvenile loggerhead sea turtles *Caretta caretta* in the Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 324: 281–285.

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.

Eckert, K. L.; Bjorndal, K. A.; Abreu-Grobois, F. A. & Donnelly, M. (1999). Research and management techniques for the conservation of sea turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4. Washington, DC: 235 pp.

Godfrey, M. H.; Barreto, R. & Mrosovsky, N. (1997). Metabolically-generated Heat of Developing Eggs and its Potential Effect on Sex Ratio of Sea Turtle Hatchlings. *Journal of Herpetology*, 3(4): 616-619.

Hernández-Echeagaray, O. E.; Hernández-Cornejo, R.; Harfush-Meléndez, M. & García-Gasca. (2012). A Evaluation of sex ratios of the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) on the Arribada nesting beach, La Escobilla, Mexico. *Marine Turtle Newsletter*, 133: 1216.

Hutson, J. M.; Li R.; Southwell, R. M.; Petersen, B. L.; Thorup, J. & Cortes, D. (2012). Germ cell development in the postnatal testis: the key to prevent malignancy in cryptorchidism? *Frontiers in endocrinology*, 3: 1-11.

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.

Kamel, S. J. & Mrosovsky, N. (2006). Deforestation: risk of sex ratio distortion in hawksbill sea turtles. *Ecological Applications*, 16(3): 923-931.

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.; 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. & Salera-Júnior, G. (2005). Relações entre as medidas das gônadas de machos e fêmeas em recém-eclodidos de *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848). *Publicações Avulsas - Instituto Pau Brasil de História Natural*, 8(9): 91-94.

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.

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.

Martins, M. & Molina, F. B. (2008). Panorama geral dos répteis ameaçados do Brasil. In: Machado, A. B. M.; Drummond, G. M. & Paglia, A. P. (Ed.). *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção*. Brasília e Belo Horizonte: MMA e Fundação Biodiversitas, 4: 327-334.

Mrosovsky, N. & Godfrey, M. H. (1995). Manipulating sex ratios: turtles speed ahead. *Chelonian Conservation Biology*, 1: 238-240.

Mrosovsky, N. & Yntema, C. L. (1980). Temperature Dependence of Sexual Differentiation in Sea Turtles: Implications for Conservation Practices. *Biological Conservation*, 18: 271-280.

Otsuka, S.; Suzuki, M.; Kamezaki, N.; Shima, T.; Wakatsuki, M.; Kon, Y. & Ohtaishi N. (2008). Growth-Related changes in histology and immunolocalization of steroid hormone receptors in gonads of the immature male green turtle (*Chelonia mydas*). *Journal Of Experimental Zoology*, 309: 166-174.

Owens, D. W. (1999). Reproductive cycles and endocrinology. In *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*, Eckert, K.L.; Bjorndal, K.A.; Abreu-Grobois, F.A. & Donnelly, M. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication 4: 119-123.

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.

Owens, D. W.; Hendrickson, J. R.; Lance, V. & Callard, I. P. (1978). A Technique for determining sex of immature greens using a radioimmunoassay. *Herpetologica*, 34: 270-273.

Pieau, C. & Dorizzi, M. (2004). Oestrogens and temperature-dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads. *Journal of Endocrinology*, 181: 367-377.

Smith, N. J. H. (1979). Quelônios da Amazônia: um recurso ameaçado. *Acta Amazonica*, 9(1): 87-97.

Souza, R. R. & Vogt R. C. (1994). Incubation temperature influences sex and hatchling size in the Neotropical turtle *Podocnemis unifilis*. *Journal of Herpetology*, 28(4): 453- 464.

Valenzuela, N.; Adams, D. C.; Bowden, R. M. & Gauger, A. C. (2004). Geometric morphometric sex estimation for hatchling turtles: a powerful alternative for detecting subtle sexual shape dimorphism. *Copeia*, 4: 735-742.

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.

Wibbels, T.; Balazs, G. H.; Owens, D. W. & Amoss, M. S., Jr. (1993). Sex ratio of immature green turtles inhabiting the Hawaiian Archipelago. *Journal of Herpetology*, 27: 327-329.

Wibbels, T.; Owens, D. W. & Amoss, M. S. (1987). Seasonal changes in the serum testosterone titers of loggerhead sea turtles captured along the Atlantic coast of the United States. *Proceedings of Ecology of East Florida Sea Turtles*, 1: 59-64.

Wilhelm, D.; Palmer, S. & Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews*, 87: 1-28.

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.

Yao, H. H; Matzuk, M. M; Jorgez, C. J; Menke, D.B; Page D.C; Swain, A & Capel B. (2004). Follistatin operates downstream of in mammalian ovary organogenesis. *Developmental Dynamics*, 230 (2): 210-215.

Yazawa, T.; Imamichi, Y.; Miyamoto, K.; Uwada, J.; Khan, M. R. I. & Taniguchi, T. (2015). Overviews of stem cells for gonadal and adrenal steroidogenic cells. *American Journal of Life Sciences*, 3(3-2): 58-64.

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

9. COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADAS AO PROJETO (ANEXOS)

1. Lopes, T.S.; Ferreira, J.M.; Azevedo, S.H.S.; Andrade, P.C.M.; Duncan, W.P.; Sexagem em filhotes do quelônio *Podocnemis unifilis* baseada na análise hormonal, visualização da anatomia e histologia das gônadas. In Congresso Brasileiro de Zootecnia- 2015, Fortaleza, Ceará.
2. Lopes, T.S.; Lima, A.K.L.; Ferreira, J.M.; Andrade, P.C.M.; Duncan, W.P.; Sexagem histológica e visual em recém-eclodidos de quelônios aquáticos (Testudines: Podocnemididae). In: XXIII CONIC- Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas- UFAM, 2014, Manaus, Amazonas.
3. Ferreira, J.M.; Lopes, T.S.; Andrade, P.C.M.; Duncan, W.P.; Evaluation of non-lethal method of sex identification in freshwater turtles (Testudines: Podocnemididae) hatchlings. In: X Congreso Latinoamericano de Herpetología, 2014, Colombia.
4. Silva-Maria, I., Martins, J.M., Lopes, T.S., Santos, Y.V.S., Andrade, P.C.M., Duncan. The Importance of Residual Yolk In The Management Of Hatchings Of Aquatic Turtles (Testudines: Podocnemididae). In: X Congreso Latinoamericano de Herpetología, 2014, Colombia.





X Congreso Latinoamericano de Herpetología

Certifica que el trabajo titulado

**THE IMPORTANCE OF RESIDUAL YOLK IN THE MANAGEMENT OF HATCHINGS OF AQUATIC TURTLES
(TESTUDINES: PODOCNEMIDIDAE)**

Por

Maria-Silva, Isabel - Universidade Federal do Amazonas, mariaisa21silva@gmail.com
Ferreira, Joseany Martins - Universidade Federal do Amazonas, joseany.martins@gmail.com
Lopes, Tayanne da Silva - Universidade Federal do Amazonas, tayannelopes19@gmail.com,
Santos, Yago Vinicius Serra dos - Universidade Federal do Amazonas, yvserra@gmail.com
Andrade, Paulo César Machado - Universidade Federal do Amazonas, pcmandra@yahoo.com.br,
Duncan, Wallice Paxiuba - Universidade Federal do Amazonas, wduncan@ufam.edu.br

fue presentado en el

H Tema 10 - Conservación

Evento realizado en la ciudad de Cartagena D.T, Colombia del 1 al 5 de diciembre de 2014,
www.aczcolombia.org - info@aczcolombia.org



La biodiversidad sensible, un patrimonio natural irremplazable.



X Congreso Latinoamericano de Herpetología

Certifica que el trabajo titulado

EVALUATION OF NON-LETHAL METHOD OF SEX IDENTIFICATION IN FRESHWATER TURTLES (TESTUDINES: PODOCNEMIDIDAE) HATCHLINGS

Por

Ferreira, Joseany Martins - Universidade Federal do Amazonas, joseany.martins@gmail.com
 Lopes, Tayanne da Silva - Universidade Federal do Amazonas, tayannelopes19@gmail.com,
 Andrade, Paulo César Machado - Universidade Federal do Amazonas, pcmandra@yahoo.com.br,
 Duncan, Wallace Paxiuba - Universidade Federal do Amazonas, wduncan@ufam.edu.br

fue presentado en el

H1 - II Simposio Biología y conservación de tortugas continentales

Evento realizado en la ciudad de Cartagena D.T, Colombia del 1 al 5 de diciembre de 2014
www.aczcolombia.org - info@aczcolombia.org



La biodiversidad sensible, un patrimonio natural irremplazable.