



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E**  
**BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**

**BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO DE TARTARUGA AMAZÔNICA**  
**(*Kinosternon scorpioides*) EM CATIVEIRO**

**LIANNE POLLIANNE FERNANDES ARAUJO CHAVES**

**São Luís-MA**  
**Agosto – 2020**

**LIANNE POLLIANNE FERNANDES ARAUJO CHAVES**

**BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO DE TARTARUGA AMAZÔNICA  
(*Kinosternon scorpioides*) EM CATIVEIRO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, da Universidade Federal do Maranhão-UFMA, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade.

Orientador: Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa  
Co-orientadora: Lígia Tchaicka

**São Luís-MA  
Agosto – 2020**

Chaves, Lianne Pollianne Fernandes Araujo.

Biologia do desenvolvimento de tartaruga amazônica (*Kinosternon scorpioides*) em cativeiro / Lianne Pollianne Fernandes Araujo Chaves. – São Luís, 2020.

85 f

Tese (Doutorado) – Curso de Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Universidade Estadual do Maranhão, 2020.

Orientador: Dra. Alana Lislea de Sousa.

1.Estágios embrionários. 2.Diferenciação sexual. 3.Determinação sexual. 4.Dependente da temperatura (TSD). 5.Determinação sexual genotípica (TSG). I.Título.

CDU: 636.98.082

**LIANNE POLLIANNE FERNANDES ARAUJO CHAVES**

**BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO DE TARTARUGA AMAZÔNICA  
(*Kinosternon scorpioides*) EM CATIVEIRO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, da Universidade Federal do Maranhão-UFMA, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade.

Orientador: Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa

Co-orientadora: Lígia Tchaicka

**Banca examinadora**

---

Presidente da banca

---

Examinador 2

---

Examinador 3

---

Examinador 4

---

Examinador 5

Dedico:

A minha avó Maria Conceição Ferreira

(*in memória*), meu exemplo de vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que está ao meu lado sempre;

À Universidade Estadual do Maranhão, em especial ao Programa de Pós-Graduação Ciência Animal pelo apoio e parceria, e à Universidade Federal do Maranhão, através do Programa Bionorte pela oportunidade;

À minha orientadora, Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa: serei eternamente grata por toda confiança e pelas oportunidades. À senhora dedico minha admiração amizade e carisma

À minha coorientadora, Profa. Dra. Ligia Tckaica pelos ensinamentos, confiança e oportunidades de novos aprendizados.

As minhas duas mães Jacy e Jorselir pelo amor, pela paciência, e por terem me ajudado a suporta os momentos difíceis da minha vida

Ao meu querido esposo Kéliton Chaves pela compreensão, paciência, companheirismo e amor que me dedicou nos momentos difíceis desta etapa.

A toda minha família em especial ao meu pai Jonivaldo Araujo e aos meus irmãos Érika Pollianne e Thiago Ferreira por me amparar, me dá força e estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

As minhas sobrinhas, Mariana e Manuela que trazem muita felicidade para minha vida.

A Elba Perreira Chaves pela contribuição e principalmente pela amizade construída;

Ao Grupo Granato e a todos os alunos que me disponibilizaram seu tempo para o desenvolvimento desta pesquisa. Em especial a aluna Juliana Maria.

Aos Laboratórios de Biodiversidade Molecular e Patologia Molecular pela acolhida, treinamento e desenvolvimento deste trabalho, em especial a Hanna Gabrielly, Larissa Sarmento, Taná, Elayne e Daniele.

Ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da USP, por me receber para realizar parte da metodologia deste trabalho;

A todos os alunos da turma da 2016 da Pós-graduação da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia (Bionorte)

A todos os professores da Pós- graduação do da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia (Bionorte)

À CAPES, pela concessão da bolsa de pós-graduação

Ao IBAMA por acreditar e apoiar esta pesquisa;

CHAVES, Lianne Pollianne Fernandes Araujo. **BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO DE TARTARUGA AMAZÔNICA (*Kinosternon scorpioides*) EM CATIVEIRO** 2020. p. 85, Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia- Bionorte) - Universidade Estadual do Maranhão – São Luís, 2020.

## RESUMO

O jurará tem sido alvo de grande atividade exploratória, no Delta do Amazonas e no Estado do Maranhão na Baixada Maranhense. Não existem relatos na literatura sobre a densidade populacional da espécie em ambiente natural, embora se tenha observado um decréscimo significativo, na região foco de estudo. Esta pesquisa tem objetivo de caracterizar a biologia do desenvolvimento do *K. scorpioides*, tendo como base diferenciação sexual no período embrionário e desenvolvimento das gônadas após o nascimento. Para a descrição fenotípica, utilizou-se 75 ovos incubados a uma temperatura média de 28° C e os embriões coletados em intervalos regulares de 1 semana. Observou-se 15 estágios embrionários para espécies com ciclo reprodutivo de desenvolvimento de 15 semanas o equivalente a 105 dias de incubação. Somente aos 42 dias (6° semana) percebeu-se a caracterização morfológica de um quelônio e na 12° semana (Estágio XII) a caracterização fenotípica da espécie *Kinosternon scorpioides*. Em relação a expressão de genes específicos na determinação sexual, a imunorreação da enzima citocromo p450 aromatase e Sox 9 foram positivos no complexo mesonefro-gônada em todas as fases embrionária estudadas. Em *Kinostenon scorpioides* as fases do desenvolvimento embrionário ocorreram em momentos de formações estruturais semelhantes a outras tartarugas, mesmo em períodos de tempos diferentes.

**Palavras – Chaves:** Estágios embrionários, diferenciação sexual, determinação sexual dependente da temperatura (TSD), determinação sexual genotípica (DSG)

CHAVES, Lianne Pollianne Fernandes Araujo. **BIOLOGY OF AMAZONIC TURTLE (*Kinosternon scorpioides*) DEVELOPMENT IN CAPTIVITY** 2020. p. 85, Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia- Bionorte) - Universidade Estadual do Maranhão – São Luís, 2020.

### ABSTRACT

The jurará has been the target of great exploratory activity in the Amazonas Delta and in the State of Maranhão in the Baixada Maranhense. There are no reports in the literature on the population density of the species in a natural environment, although a significant decrease has been observed in the region under study. This research aims to characterize the developmental biology of *K. scorpioides*, based on sexual differentiation in the embryonic period and development of the gonads after birth. For the phenotypic description, 75 eggs were incubated at an average temperature of 28 ° C and the embryos were collected at regular intervals of 1 week. There were 15 embryonic stages for species with a 15-week reproductive development cycle, equivalent to 105 days of incubation. Only at 42 days (6th week) was the morphological characterization of a chelonian noticed and at the 12th week (Stage XII) the phenotypic characterization of the species *Kinosternon scorpioides*. Regarding the expression of specific genes in sexual determination, the immunoreaction of the enzyme cytochrome p450 aromatase and Sox 9 were positive in the mesonephro-gonad complex in all embryonic phases studied. In *Kinosternon scorpioides*, the phases of embryonic development occurred in moments of structural formations similar to other turtles, even at different times.

**Key Words:** Embryonic stages, sexual differentiation, temperature dependent sex determination (TSD), genotypic sex determination (DSG)

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 01 e 02:** Desenvolvimento embrionário de *Kinosternon scorpioides*.

**Figura 03:** Eletromicrografia dos membros torácico de embriões de *Kinosternon scorpioides*.

**Figura 04:** Eletromicrografia dos cabeça de embriões de *Kinosternon scorpioides*.

### CAPÍTULO II

**Figura 01:** Imunolocalização da proteína Sox9 e enzima p450 aromatase em complexo gônada- nefron de embriões de *Kinosternon scorpioides*.

**Figura 02:** Imagem do gel dos produtos de PCR para a Protein Phosphatase 1 (PP1), Aromatase (P450) e SOX9 em testículo, ovários e complexo nefron- gônadas de filhote e embriões de *K. scorpioides*.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

**Tabela 1:** Lista de quelônios de água doce que tiveram estágios embrionários determinados

### CAPÍTULO III

**Tabela 1:** Lista de genes e iniciadores utilizados no PCR convencional.

**Tabela 2:** Análise comparativa de identidade dos genes (PP1, P450 e SOX9) de *Kinosternon scopioides* com outras espécies de quelônios.

## LISTA DE SÍMBOLOS

**Ac:** Área cardíaca

**Af:** Arco faríngeos

**Al:** Alantoide

**Am:** Âmnio

**Ap:** Abertura do plastrão

**CC:** Comprimento de carapaça

**Co:** Córion

**CP:** Comprimento do plastrão

**CTE:** Comprimento Total do Embrião

**Cv:** Coluna vertebral

**D:**Diencefalo

**Ea:** Escudo abdominal

**Ea:**Escudo abdominal

**Eax:** Escudo axilar

**Ef:** Escudo femoral

**Ef:** Escudo femoral

**Eg:** Escudo gular

**Eg:** Escudo gular

**Ei:** Escudo inguinal

**Em:** Escudos marginais

**Eu:** Escudo umeral

**Fe:**Feto

**LC:** Largura da carapaça

**LP:** Largura do plastrão

**M:** Mesencéfalo

**Md:** Mandíbula

**Mp:** Broto do membro pélvico

**Mt:**Broto do membro torácico

**Mx:** Maxila

**n:** Fosseta nasal

**P:** Prosencéfalo

**p:**Plastrão em formação

**Pc:** Processo de cauda

**Pf:** Processo fronto-nasal

**Pu:** Papila urogenital

**R:** Rombencéfalo

**S:** Somitos

**T:** Telencéfalo

**Vo:** Vesícula óptica

**Vs:** Vesícula vitelínica

## SUMÁRIO

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                                       | 15 |
| <b>2 OBJETIVOS</b>                                                        | 17 |
| 2.1 Geral                                                                 | 17 |
| 2.2 Específicos                                                           | 17 |
| <b>CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA</b>                                  | 18 |
| <b>1 <i>Kinosternon scorpioides</i> (Linnaeus, 1766)</b>                  | 18 |
| <b>2 Características Morfológicas</b>                                     | 20 |
| <b>3 Biologia Reprodutiva</b>                                             | 22 |
| <b>4 Desenvolvimento embrionário de répteis</b>                           | 23 |
| <b>5 Determinação do sexual e desenvolvimento gonadal em répteis</b>      | 25 |
| 5.1 Fatores Extrínsecos da Determinação Sexual                            | 27 |
| 5.2 Fatores Intrínsecos da Determinação Sexual                            | 31 |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                      | 36 |
| <b>CAPÍTULO II: ESTÁGIO EMBRIONÁRIO DE <i>Kinosternon scorpioides</i></b> | 47 |
| <b>(TESTUDINES, KINOSTERNIDAE)</b>                                        |    |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                      | 50 |
| <b>2. MATERIAL E MÉTODO</b>                                               | 51 |
| 2.1 Animais                                                               | 51 |
| 2.2 Coleta de ovos e embriões                                             | 52 |
| 2.3 Descrição dos estágio embrionarios                                    | 53 |
| <b>3. RESULTADO</b>                                                       | 53 |
| 3.1 Cabeça e desenvolvimento axial                                        | 53 |
| 3.2 Desenvolvimento apendicular                                           | 54 |
| 3.3 Diferenciação sexual macroscópica                                     | 55 |
| <b>4. DISCUSSÃO</b>                                                       | 56 |
| <b>5. CONCLUSÃO</b>                                                       | 59 |
| <b>REFERENCIAS</b>                                                        | 60 |
| <b>APENDICE</b>                                                           | 63 |

|                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>CAPÍTULO III: IMUNOLOCALIZAÇÃO E EXPRESSÃO GÊNICA DE P450 E SXO9: ASPECTO DO DESENVOLVIMENTO GONADAL DE <i>Kinosternon scorpioides</i> (TESTUDINES, KINOSTERNIDAE).</b> | 69 |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                                                       | 72 |
| <b>2. MATERIAL E MÉTODO</b>                                                                                                                                                | 73 |
| 2.1 Local de Estudo e Licenças de Autorização                                                                                                                              | 73 |
| 2.2 Obtenção das amostras                                                                                                                                                  | 73 |
| 2. 3 Imunohistoquímica                                                                                                                                                     | 74 |
| 2. 4 Análises moleculares                                                                                                                                                  | 75 |
| 2.4.1 Extração de RNA, PCR convencional e otimização dos iniciadores da PCR                                                                                                | 75 |
| 2.4.2 Sequenciamento e Análises de Dados                                                                                                                                   | 76 |
| <b>3. RESULTADOS</b>                                                                                                                                                       | 77 |
| 3.1 Imunohistoquímica                                                                                                                                                      | 77 |
| 3.2 Análise molecular                                                                                                                                                      | 77 |
| <b>4. DISCUSSÃO</b>                                                                                                                                                        | 79 |
| <b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>                                                                                                                                             | 82 |
| <b>6. REFERÊNCIAS</b>                                                                                                                                                      | 84 |

## 1. INTRODUÇÃO

Investigações sobre a reprodução em cativeiro de quelônios são fundamentais para assegurar sustentabilidade, preservação e estabelecimento de planos de manejo reprodutivo da fauna silvestre. Em geral, os quelônios apresentam baixas taxas de crescimento sendo um fator para não alcançarem a maturidade. Estes ficam por mais tempo expostos ao risco de extinção pela caça exploratória e demais fatores que levariam a deleção da espécie. Esses fatores aumentam a mortalidade entre adultos e reduzem o recrutamento de jovens na manutenção da população (TEIXEIRA, 2009).

Diversos estudos voltados para a conservação do *Kinosternon scorpioides* foram realizados (SILVA, 2012). Desses, sem dúvida a reprodução em cativeiro faz-se importante por ser uma alternativa eficaz no processo de conservação da fauna (BILSKI, 2011). Assim, informações embriológicas básicas podem fornecer instruções importantes para a tomada de decisões sobre assuntos relacionados à conservação, manejo e os efeitos da intervenção nos ninhos das espécies de tartarugas (KASKA & DOWNIE, 1999). Dessa forma a embriologia de répteis vem sendo considerada componente importante das áreas de biologia molecular e de desenvolvimento. Uma vez que a diferenciação sexual nas tartarugas é dependente da temperatura, sendo determinada no segundo terço do desenvolvimento embrionário, podendo alguns fatores interferir na temperatura, como umidade do solo e vegetação local (POUGH et al., 1993), e pode ser influenciada por fatores externos, como a temperatura de incubação dos ovos (BULL & VOGT, 1981; MOELLER, 2013; MROSOVSKY & PIEAU, 1991).

Nesse contexto se insere, o *Kinosternon scorpioides*, quelônios de água doce, pertencente à família Kinosternidae, integrantes da fauna silvestre amazônica e maranhense com ampla distribuição geográfica e de importância social, cultural, econômica e ambiental, devido ao uso na culinária exótica regional. Seu consumo é intensificado, mesmo a despeito da lei de crimes ambientais. Estes fatos fazem com que a espécie seja ameaçada pelo homem devido à sua retirada da natureza, sem um plano de manejo para o uso desse recurso, tendo como consequência seu declínio populacional que pode se refletir na extinção futura da espécie (PEREIRA et al, 2007). Entretanto, há ainda muitas lacunas; necessitando de mais esclarecimentos científicos com o intuito de conhecer as características da biologia reprodutiva, bem como os aspectos envolvendo a reprodução em cativeiro que venham atender a demanda de uso sustentável com a produção comercial baseado na Instrução Normativa nº 169, de 20 de fevereiro de 2008.

A sazonalidade exerce influência no processo reprodutivo de *K. scorpioides*, podendo o ciclo ser sincronizado por fatores climáticos, alimentares e hormonais. Outro fator ambiental importante para a espécie citada, assim como para os demais répteis, é a temperatura, que interfere no processo de incubação dos ovos e na determinação sexual dos filhotes, controlado por esse fator (FERREIRA-JÚNIOR, 2009; VIANA et al., 2013).

Em contraste com mamíferos e aves que apresentam cromossomos sexuais heteromórficos, não foram identificadas em répteis, inclusive nas tartarugas marinhas, características na morfologia dos cromossomos que pudessem diferenciar machos de fêmeas. O número de genes tem sido avaliado como uma característica em potencial para a determinação sexual e consequente diferenciação gonadal. A região determinante para testículos em mamíferos, SRY, não ocorre nos répteis e nas aves (WIBBELS, 2003).

Um ponto importante na conservação dos quelônios deve ser o conhecimento dos padrões de uso, o efeito da utilização sobre as populações naturais e sua importância para a subsistência comunitária. O valor intrínseco das tartarugas pode ser considerado como ferramenta para construir projetos sustentáveis, apoiando-se necessariamente tal conhecimento sociocultural com pesquisas biológicas e ecológicas fundamentais (MITTERMEIER, 1992; PINEDO-VASQUEZ *et al.*, 2002).

Muitas espécies de quelônios estão ameaçadas em consequência da perseguição desmedida do homem, que destrói os ovos, pratica a caça predatória na época de reprodução, e destrói o habitat natural desses animais (FANTIN, 2008). Sendo assim, o entendimento sobre o desenvolvimento embriológico e a diferenciação sexual e maturação gonadal associada a influência da expressão gênica de proteínas específicas, torna-se essencial para detectar fatores que controlam a ecologia, a reprodução e a distribuição geográfica desse grupo pouco estudado de vertebrados. Podendo dessa forma, direcionar estratégias de reprodução em cativeiro, além de permitir um plano de manejo com uso sustentável e ênfase na conservação da espécie no ambiente natural, contribuindo para conservação da biodiversidade Amazônica.

Dessa forma, este trabalho foi dividido nos seguintes capítulos: Capítulo 1: Revisão de Literatura; Capítulo 2: Stages of Embryonic Development of the Amazonian Turtle *Kinosternon scorpioides* (Testudines, Kinosternidae); Capítulo 3: Diferenciação Sexual e Expressão Gênica de PP1, P450, SF1 E SXO9: Aspecto do Desenvolvimento Gonadal de *Kinosternon scorpioides* (Testudines, Kinosternidae).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

- Caracterizar a biologia do desenvolvimento do *K. scorpioides*, tendo como base a diferenciação sexual no período embrionário e desenvolvimento das gônadas após o nascimento.

### **2.2 Específicos**

- Descrever os estágios embrionário do *K. scorpioides*.
- Avaliar a expressão gênica e proteica da aromatase P450, SF1 (fator esteroidogênico) e SOX9 no complexo gônada-mesonefro de *K. scorpioides* nos estágios embrionário, nas gônadas de embriões e filhotes.

## **CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA**

---

## 1. *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766)

A espécie *Kinosternon scorpioides*, é uma tartaruga de água doce pertencente à família Kinosternidae, recebe algumas denominações comuns, sendo referendada como *tartaruga do lodo*, *tartaruga almiscarada*, *tartaruga escorpião do lodo*, *tortuga de ciénaga de água*, *muçua*, *capininga*, *jurará*, *Ashna charapa*, *Loro charapa*, *Tortuga bico de papagayo*, *Tortuga buitire*, *Tapaculo*, *Chiribí-chivirí*, *Galápago mión*, *Miona*, *Guachupe*, *Pivichigua*, *Morrocoy água*, *Pecho quebrado* (BRITES et al., 2009; VOGT et al., 2015). Essas denominações são referências aos seus hábitos de vida, região do habitat ou em virtude da sua morfologia.

O gênero *Kinosternon* é formado por 19 espécies, entre estas o *Kinosternon scorpioides* que ocorre nas três Américas, sendo de ampla distribuição geográfica atingindo 20 países: Brasil, México, Belize, Bolívia, Colômbia, Costa Rica, Equador, Panamá, Argentina, Paraguai, El Salvador, Guina Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, Nicarágua, Peru, Venezuela, Suriname e Trindade. (ALVAREZ DEL TORO, 1982; BERRY e IVERSON, 2001; CROTHER, 1999; ERNEST e BARBOUR, 1989; FLORES-VILLELA, 1993; FREIBERG, 1981; ROCHA e MOLINA, 1990; SCHWARTZ e HENDERSON, 1991; VAN DIJK et. al., 2014). No Brasil, ocorre na Regiões Norte e Nordeste, nos Estados do Amazonas, Pará, Amapá, Rondônia, Mato Grosso, Maranhão, Tocantins, Goiás, e Minas Gerais. (VOGT et al. 2015). No Estado do Maranhão, *K. scorpioides* é conhecido popularmente como jurará, e é um importante componente da história das comunidades humanas. Na região da Baixada Maranhense, onde a espécie têm sido recurso alimentar e fonte de renda de algumas famílias, é possível perceber o reflexo da sua superexploração. É comercializado nas formas adultas e subadultas, principalmente nos meses de maio a agosto, quando as fêmeas se apresentam ovadas, em período importante do ciclo reprodutivo. (BARRETO et al., 2011; CABRERA & COLANTONIO, 1997; CASTRO, 2006; PEREIRA et al., 2007).

O *Kinosternon scorpioides*, possui hábitos semi-aquáticos, com ampla tolerância ecológica, vivendo na natureza em riachos, margens dos lagos, pântanos e lagoas temporárias e em diferentes ecossistemas (SILVA, 2006). No Maranhão, permanece em águas com temperaturas que variam de 26 a 30° C. No período seco, quando as condições climáticas e alimentares são desfavoráveis, as mesmas encontram-se enterradas sob o solo

em estado de baixo metabolismo e reservas energéticas. Este mecanismo é conhecido como estivação e está inteiramente ligado às oscilações de temperaturas ambientais, regulando assim, sua temperatura corporal, de modo a evitar o estresse térmico (PEREIRA et al., 2007). Possui hábito de espécie onívora, pois se alimenta de peixes, girinos, anfíbios adultos, insetos, algas, restos vegetais, crustáceos e gastrópodes (ACUÑA-MESÉN et al., 1994; DELDUQUE, 2000; VANZOLINI et al., 1980).

## **2. Características Morfológicas**

Os padrões morfológicos e biométricos de *K. scorpioides* são conhecidos através de características importantes que podem ser associadas ao seu hábito de vida e comportamentais em ambiente natural. Estas tartarugas possuem um estojo ósseo protetor, formado pela carapaça e plastrão unidos entre si por uma ponte óssea, este aspecto permite que ela mantenha um mecanismo de proteção ocasionado pelo recolhimento dos membros, da cabeça e pescoço. Segundo Castro (2006) e Pereira et al. (2007), o tamanho médio da carapaça e plastrão das fêmeas é 15,26 e 13,35cm respectivamente, e dos machos variam de 14,79 e 12,30 cm, sendo, portanto menores que as fêmeas. O peso também pode variar entre os sexos: as fêmeas são mais pesadas apresentando peso médio de 430,08g e os machos de 315,05.

O animal adulto apresenta cabeça triangular de coloração mais clara do que nas outras subespécies (marrom, cinza, ou verde oliva escuro) com manchas e pontos marrom claro, amarelo ou cinza suave (BERRY & IVERSON, 2011). O pescoço não possui marcas, sendo de coloração cinza ou negra. A porção rostral localiza-se o focinho alongado, e sua mandíbula possui uma estrutura córnea (ranfoteca) em formato de bico de papagaio proeminente (PEREIRA & LEMOS, 2007). Possui 6 a 8 barbelas mentonianas na porção ventral, a partir da cabeça até o pescoço (RUEDA-ALMONACID et al., 2007).

A carapaça possui coloração que varia de marrom claro a verde oliva ou preto, é formada por onze a treze escudos marginais e está ligada ao plastrão através de largas pontes, escudos intermediários, ditos escudo axilar e escudo inguinal (BERRY & IVERSON, 2001; PRITCHARD & TREBBAU, 1984). Possui a carapaça ovalada e tricarínada e o plastrão, de cor variável, com duas “dobradiças”, com placas móveis. Sua

cauda possui uma estrutura córnea na extremidade, que antigamente acreditava-se ser um ferrão, usado para defesa, tal como em um escorpião. Daí tal denominação científica escorpioide. A única função desta estrutura córnea é de segurar a fêmea durante o acasalamento. Possuem mandíbula muito forte, capaz de uma potente e dolorosa mordida (DELDUQUE, 2000; IVERSON, 1989).

Os filhotes apresentam a carapaça de cor negra com pequenas manchas amarelas na borda, o plastrão amarelo nas extremidades e negro no centro. Apresentam o pescoço, os membros e a cauda de cor cinza. A cabeça é bem grande, amarela com pintas pretas, a maxila e a mandíbula são amarelas com pintas pretas. A cauda em todos os recém-nascidos apresentava o mesmo tamanho, ou seja, curta (CASTRO, 2006).

No *K. scorpioides* o dimorfismo sexual é evidente quando adultos, sendo as fêmeas maiores e mais robustas que os machos. Isto é justificado pela necessidade destas fêmeas carregarem os ovos em seu ventre e consumirem maior quantidade de energia (BERRY & SHINE, 1980). Já os machos são menores para que não haja uma grande competição pelo alimento, permitindo assim um melhor equilíbrio do recurso alimentar existente, do habitat, e da população (CASTRO, 2006). A carapaça nas fêmeas é mais alta, e a cauda nos machos é três vezes mais longa que a da fêmea. O plastrão dos machos é côncavo para facilitar a cópula, já a fêmea apresenta esta estrutura reta e a cabeça é mais escura e robusta, sendo a ranfoteca superior bem desenvolvida (CASTRO, 2006; PEREIRA & LEMOS, 2007). Os primeiros sinais de dimorfismo sexual em *K. scorpioides* foram perceptíveis quando os animais alcançaram 22,49 meses (1 ano e 8 meses) de idade, neste período o comprimento de carapaça foi de 9,4 cm, evidenciando-se com o escurecimento da cabeça e aumento no tamanho da cauda nos machos, e as fêmeas permanecendo com a cauda curta e a cabeça amarelada (CASTRO, 2006).

Em muitas espécies de Testudines, o dimorfismo sexual, somente é visível após alguns anos de vida, sendo que nos embriões e filhotes recém-eclodidos o meio mais seguro para se aferir o sexo são estudos histológicos. A análise histológica de *C. serpentina* realizada por Yntema (1976) serve de orientação para outras espécies. Outros estudos, mostraram que a partir da aplicação dos princípios da morfometria geométrica foi possível correlacionar o sexo dos filhotes recém-eclodidos das tartarugas de água doce *Podocnemis expansa* e *Chrysemys picta* com a forma da carapaça (VALENZUELA et al.,

2004). Em tartarugas marinhas juvenis, a determinação sexual ocorrerá através de técnicas como radioimunoensaio (dosagem hormonal), exames de laparoscopia e histologia gonadal, considerado este o método mais seguro (MILLER, 1997). Entretanto esta técnica demonstra dificuldades para ser utilizada em campo, onde são geralmente encontrados animais em estágios iniciais de decomposição (CERIANE & WYNEKEN, 2007).

### **3. Biologia Reprodutiva**

Em *K. scorpioides* a reprodução é sazonal, sendo possível observar que o período chuvoso corresponde a época da reprodução, com acasalamento nos meses de abril a agosto. A cópula ocorre na água, com o macho cortejando a fêmea, seguida da perseguição, domínio e monta, apoiando as quatro patas sobre a carapaça e com movimentos da cauda ventralmente em busca da abertura cloacal até a introdução do pênis no seu interior. Por outro lado, no período seco (outubro a janeiro), tem-se a postura das fêmeas e no final da estação seca para o início da chuvosa o nascimento dos filhotes e a reorganização dos animais para um novo ciclo reprodutivo (CHAVES, 2020). Essas observações foram obtidas de indivíduos mantidos em Cativeiro Experimental no Criadouro da Universidade Estadual do Maranhão licenciado pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis- IBAMA conforme autorização nº 1899339/2008.

A nidificação, segue um mesmo padrão para os quelônios em geral, onde a postura de tartarugas usualmente segue uma bem definida sequência de fases comuns: preparação do local do ninho, escavação do ninho, postura e fechamento e cobertura do ninho. (EHRENFELD, 1979; HAILMANN & ELOWSON, 1992). Vale ressaltar que de acordo com Silva (2011), a postura das fêmeas mantidas em cativeiro ocorre prioritariamente no período seco. Sabe-se que as fêmeas da espécie depositam seus ovos em solo argiloso e logo após 150 dias de incubação ocorre eclosão dos filhotes (CASTRO, 2006; CAVALCANTE et al., 2011; DELDUQUE, 2000; MOLINA & LISBOA, 2007). O período de incubação dos ovos da espécie mantida em cativeiro é de aproximadamente 195 dias com variação de 150 a 291 dias (ANUNCIAÇÃO, 2013).

Depois de um período de quatro a cinco meses, o filhote nasce medindo entre 3 e 4 centímetros de comprimento da carapaça, pesando entre 6 e 8 g. A casca é rompida com um tipo de dente que possuem abaixo das narinas, chamado overruptor (carúncula) e vão em direção à água (ROCHA & MOLINA, 1990).

A maturidade sexual dos quelônios é definida pelas características macroscópicas gerais, tais como tamanho da carapaça e plastrão (BERNHARD, 2001). Para Ferreira-Júnior, (2009b), o tempo de maturação em algumas espécies de quelônios, é determinada pela idade, pelo peso e pelo comprimento de carapaça ou plastrão. Nas fêmeas de vida livre a maturidade sexual ocorre em torno de 5 anos (VOGT, 2008), e em fêmeas de cativeiro entre 2,8 a 4 anos (CASTRO, 2006).

#### **4. Desenvolvimento embrionário de Répteis**

O desenvolvimento embrionário inicia-se após sucessivas divisões celulares mitóticas do zigoto. Esse processo é conhecido por clivagem. Em todos os grupos de cordados, a clivagem converte um zigoto de uma única célula em uma blástula oca e multicelular. Variações no processo fundamental de clivagem resultam da diferença na quantidade de vitelo armazenado no óvulo de cada espécie. Os embriões de répteis possuem vitelo em abundância e clivagem do tipo discoidal, uma vez que seu extenso material vitelínico do pólo vegetativo permanece indivisível (KARDONG, 2010). Em testudines a embriogênese é iniciada com o aparecimento simultâneo dos três tipos de folhetos embrionários durante o período de gastrulação: o ectoderma (camada de células mais externa), mesoderma (camada intermediária) e endoderma (camada mais interna) (MILLER; LIMPUS, 2003)

O estabelecimento dos estágios embrionários de répteis foram definidos de acordo com o aparecimento contínuo de distintas características morfológicas externas em determinado momento do desenvolvimento. Essas características são descritas detalhadamente e são consideradas critérios para o reconhecimento diferencial de cada estágio (VIEIRA, 2011).

Fatores como a temperatura, a umidade e a oxigenação são variáveis de grande importância na embriogênese dos quelônios, pois influenciam diretamente a taxa de

desenvolvimento, duração da incubação, tamanho dos filhotes, metabolismo, comportamento e principalmente determinação sexual (BULL, 1985; CAGLE et al., 1993; GETTINGER et al., 1984; GREENBAUM, 2002; LESHEM & DMI'EL, 1986; MILLER et al., 1987; OKADA et al., 2011).

Para padronizar as comparações de desenvolvimento entre espécies, trabalhos anteriores sugeriram o uso de medidas de tamanho corporal, idade cronológica e estágio morfológico (HALL & MIYAKE, 1995). Devido a tamanhos diferentes e ao tempo de desenvolvimento associado a diferentes espécies ou condições experimentais, comparações interespecíficas são ofuscadas ou impossíveis quando medidas ou dados de idade cronológica absoluta são usados sem outras informações (GREENBAUM & CARR, 2002).

No que se refere aos Testudines, ordem dos quelônios, muitos já tiveram seus estágios embrionários determinados, como descrevem os estudos realizados: para *Chelydra serpentina* por Yntema (1968); *Lepidochelys olivacea* por Crastz (1982); *Pelodiscus sinensis* por Tokita & Kuratani (2001); *Trachemys scripta* por Greenbaum (2002); *Emydura subglobosa* por Werneburg et al., (2009); *Podocnemis expansa* por Magalhães (2017), sendo este último realizado no Brasil.

Dentro da ordem dos Testudines, Yntema (1968) foi um dos primeiros a fornecer um padrão normal de estágios embrionários. Para *Chelydra serpentina* descreveu 27 estágios, e seu estudo foi considerado um “modelo teste” para muitas outras descrições embriológicas em diferentes espécies de quelônios. No entanto, a maioria dos pesquisadores de desenvolvimento embrionário de tartarugas citam o esquema de estagiamento de Yntema (1968) sem abordar as formas em que o desenvolvimento de seus embriões difere de *C. serpentina* (CREWS et al., 1991; GREENBAUM e CARR, 2001; WHITE e THOMAS, 1992).

Greenbaum (2002), utilizou a morfologia do membro anterior como principal critério para delimitar os estágios, uma vez que essa característica é facilmente localizada a partir da segunda metade do desenvolvimento e está altamente conservado entre a maioria dos táxons de tartarugas. Já Magalhães (2017), destacou para *Podocnemis expansa*, características morfológicas que foram facilmente comparáveis com outras

espécies de tartarugas, como os olhos, processo mandibular, membros e desenvolvimento da carapaça.

## **5. Determinação do sexual e desenvolvimento gonadal em répteis**

Conceitualmente, a determinação do sexo nos vertebrados é definida como a decisão que conduz uma gônada bipotencial a se desenvolver em testículos ou ovários (BARSKE & CAPEL, 2008). Nos vertebrados, pode-se observar uma grande variedade de mecanismos de determinação do sexo, nos quais fatores genéticos e ambientais são fundamentais nesse processo. Genes-chave, os quais podem ou não estar presentes em cromossomos sexuais, podem atuar como desencadeadores do início dessa cascata, no que é conhecido como uma determinação sexual mediada por fatores genéticos. Quanto aos fatores ambientais envolvidos na determinação sexual, é conhecido que a temperatura, pH e fatores sociais são importantes nessas vias em diversos grupos de vertebrados (MANOLAKOU et al., 2006; SANDRA & NORMA, 2010).

A determinação do sexo varia entre os vertebrados amnióticos (mamíferos, aves e répteis). Todos os mamíferos e aves possuem determinação genotípica do sexo ou GSD (isto é, o genótipo determina o sexo), mas várias formas diferentes de GSD são aparentes. Os mamíferos possuem heterogamidade masculina (machos XY e fêmeas XX), sendo que o macho frequentemente possui cromossomos sexuais heteromórficos óbvios, enquanto a maioria das aves possui heterogamidade feminina (fêmeas ZW e machos ZZ), tendo a fêmea muitas vezes cromossomos sexuais heteromórficos óbvios. Os répteis exibem uma variedade de sistemas de determinação do sexo, incluindo os sistemas GSD XX / XY, os sistemas GSD ZZ / ZW, os sistemas GSD nos quais não foram identificados cromossomos sexuais heteromórficos e os sistemas de determinação do sexo que respondem à temperatura (determinação do sexo dependente da temperatura ou TSD). No último sistema, a temperatura de incubação do ovo determina o sexo e não foram identificados cromossomos sexuais heteromórficos, uma forma encontrada em muitos répteis de postura (BULL, 1980; EWERT E & NELSON, 1991; JANZEN & PAUKSTIS, 1991a; RAYNAUD & PIEAU, 1985).

A diferenciação gonadal ocorre durante o período termo sensível (TSP), onde esses órgãos são originados das cristas gonadais que se desenvolvem a partir de um espessamento do mesotélio, na região medial aos rins mesonéfricos (FONTENELE-

NETO et al. 2012; GILBERT, 2003; MCGEADY et al. 2006; MOORE & PERSAUD, 2008). Na diferenciação testicular, o epitélio gonadal se achata e as células germinativas os deixam para migrar para os cordões medulares. Nesses cordões algumas células epiteliais adquirem características sertólicas e assim os cordões medulares formam o princípio dos cordões seminíferos (com contorno arredondado delimitado por uma membrana basal (PIEAU et al., 1999). Enquanto que nos embriões femininos, as células somáticas do epitélio cortical e as células germinativas proliferaram para formar os folículos ovarianos primordiais (GILBERT, 2003).

A maioria das literaturas, relatam que a determinação do sexo nos quelônios está diretamente relacionada com a temperatura de incubação dos seus ovos, pois em temperaturas mais altas haveria um predomínio de fêmeas e nas mais baixas um predomínio de machos (ALHO et al., 1984; PIEAU et al., 1999; POUGH et al., 2001; VALENZUELA, 2001; VOGT AND BULL, 1982); tendo também a influência de fatores hídricos do ambiente (GUTZE & PAUKSTIS, 1983), e de muitas outras variáveis como umidade, posição dos ovos no ninho e metabolismo do embrião (VALENZUELA et al. 1997).

Durante o período termossensível, as gônadas indiferenciadas sofrem influência da temperatura e da presença de hormônios esteróides, alterando, assim, sua morfologia para testículo ou ovário (MERCHANT-LARIOS et al., 1997; MOROHASHI; BABA; TANAKA, 2013). A biologia reprodutiva das espécies TSD pode ser melhor compreendida com a investigação da influência destes hormônios sob o desenvolvimento embrionário (LEMO, 2019).

A determinação sexual dependente da temperatura (TSD) é o mecanismo mais freqüente entre os quelônios, mas em algumas espécies a determinação sexual independe da temperatura de incubação. A determinação sexual genotípica (DSG) é menos freqüente em quelônios, mas é comum em cobras e lagartos. Já foram testadas 80 espécies quanto ao modo de reprodução, destas, 64 apresentaram TSD e 16 apresentaram DSG. Essa amostragem engloba 12 das 14 famílias de quelônios e cerca de 70% das espécies conhecidas de tartarugas ainda não foram testadas quanto ao seu modo de reprodução. Cromossomos sexuais são reconhecidos em cobras e lagartos, mas são aparentemente raros em anfisbêneas e quelônios e ausentes em crocodilianos e na tuatara (*Sphenodon punctatus*) (BULL, 1980; JANZEN & PAUKISTS, 1991a)

Uma questão filogenética, aparentemente simples, mas com profundas implicações evolutivas ainda permanece sem um veredito conclusivo e diz respeito a quem surgiu primeiro, se a TSD ou a DSG. Com base em estudos filogenéticos foi sugerido que DSG é o mecanismo ancestral dos vertebrados (HEAD et al., 1987; JANZEN AND KRENZ, 2004; WIBBELS et al., 1994). Para as tartarugas, a TSD seria o mecanismo primitivo (EWERT & NELSON, 1991) e a DSG surgiu de forma independente pelo menos seis vezes dentro desse clado (JANZEN & KRENZ, 2004). Para lagartos a TSD teria se originado, independentemente, pelo menos três vezes. Dessa forma, alterações no mecanismo da determinação sexual seriam relativamente frequentes nos vertebrados (VALENZUELA & LANCE, 2004).

A identificação sexual em filhotes recém-eclodidos é desafiadora, pois os métodos mais comumente utilizados são invasivos e, por vezes, requerem a eutanásia, como as análises através de estereomicroscópios e microscopia de luz. Em estudo realizado com *T. dorbignyi*, Malvasio, Gomes e Farias (1999) afirmam que a estereomicroscopia é uma técnica eficaz para determinação sexual em filhotes com até 294 dias, sendo a histologia apenas necessária em casos duvidosos. Ademais, inferem que, mesmo quando ocorre remanescência dos ovidutos em 19 machos após o sexto mês de vida, as características morfológicas das gônadas são suficientes para distinguí-los de fêmeas.

O exame estereomicroscópico pode também ser utilizado seguramente para identificar os sexos da espécie *C. serpentina*, pois Yntema (1976) destaca que a porcentagem de machos com ovidutos remanescentes é baixa, sendo a ausência desta estrutura suficiente para ter-se mínima confusão entre os sexos. Porém, em *C. caretta*, as gônadas em filhotes recém-eclodidos parecem não apresentar distinção macróscopica, fazendo necessário o uso da histologia (YNTEMA; MROSOVSKY, 1980).

## **5.1 Fatores Extrínsecos da Determinação Sexual**

Estudos originados na década de 1960 demonstraram que a vulnerabilidade de vários répteis antecede a eclosão e tem momentos críticos durante a incubação. A descoberta de Chanier 1966, que a determinação sexual do lagarto *Agama agama* é controlada pela temperatura de incubação dos ovos abriu um novo campo de pesquisas. Esta descoberta abriu um leque para um novo cenário de pesquisas que busca determinar os elementos físicos que afetam e influenciam o sexo dos embriões de répteis.

Atualmente, existe a concordância de que a temperatura é o fator extrínseco principal da determinação sexual de inúmeras espécies de quelônios.

Pieau (1971), foi o primeiro a trabalhar com quelônios descobrindo a TSD (determinação sexual dependente da temperatura) em *Testudo graeca* e *Emys orbicularis*. Em 1979, Yntema manipulou a temperatura de incubação ao longo de vários estágios do desenvolvimento embrionário de *C. serpentina*, definindo o momento em que a temperatura age irreversivelmente sobre a diferenciação das gônadas, chamado de período termo-sensitivo. O período termo-sensitivo em tartarugas de água doce (*Graptemys*, *Chrysemys picta* e *C. serpentina*) e em tartarugas marinhas (*Caretta caretta*) é o mesmo e localiza-se no segundo terço do desenvolvimento embrionário (BULL & VOGT, 1979, 1981; VOGT & BULL, 1982 YNTEMA, 1979; YNTEMA & MROSOVSKY, 1982).

O processo de determinação sexual em espécies de Testudines está relacionado à temperatura do ambiente, entre os quais se destaca Yntema and Mrosovsky (1980) em *Caretta caretta*; Alho et al., (1985) em *Podocnemis expansa* e Malvasio et al., (1999) com *Trachemys dorbignyi*, que assim como outras espécies de Testudines, a determinação sexual é inteiramente influenciada pela variação de temperatura (MALVASIO et al., 1999), no qual o sexo dos descendentes é determinado pela temperatura de incubação durante um período sensível à temperatura (TSP) no terço médio do desenvolvimento (RAMSEY et al., 2007).

Souza & Vogt (1994), em trabalho realizado com *P. unifilis* em ambiente natural e controlado, mencionam que, em condições naturais, o sexo dos filhotes é influenciado pela temperatura de incubação dos ovos, em que em temperaturas mais altas predominam as fêmeas e nas mais baixas, os machos. Yao & Capel (2005) concluíram que várias espécies animais dependem de fatores extrínsecos, como por exemplo, a temperatura ambiente, para determinar o sexo.

O efeito cumulativo da temperatura é um fator importante na determinação sexual. No estágio inicial, no primeiro terço da incubação, a temperatura influencia a determinação sexual, mas é reversível. No segundo terço da incubação, definido como período termo-sensitivo, a determinação sexual é irreversível, (BULL & VOGT, 1981), além disso a temperatura atua na síntese de enzimas envolvidas na diferenciação das gônadas (PIEAU, 1996).

O período de termosensibilidade foi demonstrado em várias espécies de répteis e engloba o terço médio do desenvolvimento embrionário. Este período começa antes da diferenciação gonadal e se estende até um momento em que mudanças específicas de sexo estão se tornando evidentes nas gônadas. Durante o período termosensível, a determinação do sexo é sensível tanto à amplitude como à duração de uma determinada temperatura de incubação. (WIBBELS et al., 1994).

A influência da temperatura sobre a determinação sexual possibilita modificações no ambiente endócrino durante o desenvolvimento. Em *Trachemys scripta*, foi observado um aumento nas concentrações de estradiol e da atividade da enzima aromatase (P450), enzima responsável pela conversão de andrógenos em estrógeno, provocando uma produção de 100% fêmeas, diante do aumento na temperatura. Além de desencadear as cascatas hormonais, a temperatura promove a ativação/ repressão de diferentes tipos de genes ligados ao sexo. Ligados a estes, receptores hormonais específicos criam o ambiente urogenital adequado para o desenvolvimento gonadal de um ovário ou de um testículo frente à resposta hormonal. Dessa 2 forma, a temperatura de incubação, torna-se responsável pela modulação do sexo, através da ativação destes mecanismos fisiológicos (CREWS et al., 2006).

A temperatura que defini o sexo dos indivíduos depende da temperatura pivotal do ninho que produzirá uma proporção de 1:1, 50 % machos e 50 % fêmeas. Valores abaixo desta temperatura induzirá a formação de filhotes machos e acima, filhotes fêmeas (YNTENA & MROSOVSKY, 1980), sendo 29,2° C a temperatura pivotal média encontrada para ninhos de *C. caretta* no Brasil (MARCOVALDI et al., 1997), e 29° C para ninhos de *C. mydas* no Mediterrâneo (BRODERICK et al., 2000). Em *K. scorpiodes*, a temperatura determinante dos machos são desenvolvidos em temperaturas próximas a 26°C e as fêmeas em 30°C (FERREIRA-JÚNIOR, 2009). Das 29 espécies de tartaruga de água doce, oito já foram testadas, sendo que quatro apresentam determinação sexual dependente da temperatura de incubação (*Podocnemis sextuberculata*, *P. unifilis* e *P. expansa*, pertencentes à família Podocnemididae e *Kinosternon scorpioides* da família Kinosternidae) e nas outras quatro a definição do sexo independe da temperatura da incubação (*Phrynops geoffroanus*, *Mesoclemmys gibba*, *P. hilarii* da família Chelidae e *Peltocephalus dumeriliana* da família Podocnemididae). Para *Kinosternon scorpioides* os dados são ambíguos (EWERT et al., 2004) e estudos complementares são necessários para se determinar a temperatura pivotal.

A influência da temperatura de incubação não se restringe apenas à fase embrionária, estendendo-se às fases posteriores do desenvolvimento, com reflexos no modo de vida dos répteis adultos. A temperatura da incubação pode exercer efeitos sobre o fenótipo, independentemente da diferenciação sexual e essas diferenças são distintas entre os sexos e as espécies. No entanto, muitos efeitos atribuídos à temperatura da incubação podem, na verdade, ser devidos ao sexo dos filhotes e juvenis. (VALENZUELA, 2004).

As características do habitat e o microambiente dos ninhos estão ligados e têm conseqüências no desenvolvimento dos embriões e filhotes (WEISROCK & JANZEN, 2000). O local da nidificação terá influência decisiva no ambiente hídrico e termal dos ninhos, afetando ainda as trocas gasosas entre a câmara de ovos e o meio (ACKERMAN, 1980) e poderá afetar a taxa de predação e a razão sexual das espécies com DST (FERREIRA JÚNIOR et al., 2003a).

O tamanho e a coloração dos sedimentos afetam a temperatura dos ninhos de *Caretta caretta* (NARO-MACIEL et al., 1999). Ninhos localizados em sedimentos mais grossos de coloração amarela apresentam temperaturas mais elevadas que ninhos situados em sedimentos finos e brancos. Em ninhos de *C. mydas*, acontece de forma semelhante e durante o dia, ninhos com áreas de sedimentos escuros são submetidos a maiores temperaturas que aqueles localizados em areias mais claras (HAYS et al., 2001). A duração da incubação também foi afetada pela composição mineralógica dos sedimentos, ninhos situados em sedimentos quartzosos apresentaram uma duração de incubação menor que aqueles localizados em sedimentos de composição carbonática (MILTON et al. 1997)

O tamanho do quelônio também deverá influenciar a escolha do local de nidificação, pois indivíduos maiores escavam ninhos mais profundos onde as variações da temperatura são menores (BURGER, 1976B; PACKARD & PACKARD, 1988; THOMPSON, 1988b). Espécies de médio e grande porte como *C. serpentina* (PETOKAS & ALEXANDRE, 1980), *Podocnemis sextuberculata* (PEZZUTI & VOGT, 1999), *P. expansa* (ALHO et al., 1985; FERREIRA JÚNIOR & CASTRO 2003) e *Apalone mutica* (PLUMMER et al., 1994) preferem desovar em áreas abertas e arenosas, mas apresentam ninhos mais profundos. Espécies pequenas como *Kinosternon. baurii* (WILSON, 1998), desovam em ninhos rasos, evitam áreas abertas ou escolhem locais com uma maior

umidade características que podem impedir temperaturas muito elevadas que seriam fatais aos embriões (WILSON, 1998; FERREIRA JÚNIOR, 2003).

Devido à ampla distribuição geográfica dessas espécies que ocupam diferentes biomas é importante que se estabeleça o modo de reprodução e possíveis variações da temperatura pivotal, pois essas informações podem auxiliar o estabelecimento de áreas prioritárias de conservação e estratégias de manejo (FERREIRA-JUNIOR, 2009)

## **2.5.2 Fatores Intrínsecos da Determinação Sexual**

- **Hormônio**

Os estrógenos e andrógenos são importantes em ambos os sexos em vários aspectos do crescimento, no desenvolvimento e na diferenciação morfológica, bem como no desenvolvimento e na regulação do comportamento e dos ciclos sexual e reprodutivo (YANG et al., 2010). Entretanto, os passos enzimáticos que envolvem a esteroidogênese nas diferentes espécies, não estão completamente compreendidos, havendo variações no comportamento enzimático dentre as espécies de animais domésticos e silvestres.

As sugestões de temperatura e a presença dos hormônios esteroides durante o período termosensível, incidem diretamente sobre a gônada indiferenciada contribuindo para o desenvolvimento de um testículo ou ovário (MOROHASHI et al., 2013). Portanto, alterações no ambiente hormonal ou um deslocamento na temperatura podem alterar determinação sexual do embrião de tartaruga (MERCHANT et al., 1997). Durante a fase embrionária, a presença dos hormônios se constitui de suma importância para a diferenciação e estabelecimento sexual, pois genes específicos envolvidos na biossíntese de esteroides são diferentemente expressos nas células somáticas de testículos e ovários (Nakamura et. al., 1998).

As enzimas citocromo P450 aromatase se expressam nas gônadas, cérebro e sistema nervoso de todos os vertebrados e até mesmo do protocordado anfioxo, regulando a produção de hormônios esteroides sexuais e funções reprodutivas (CONLEY et al., 2009). Esta enzima age na gônada convertendo substrato de esteroide andrógeno em estrógeno, desempenhando um papel fundamental em muitas funções biológicas que dependem deste hormônio, incluindo a diferenciação sexual de embriões em desenvolvimento de vertebrados (YAO; CAPEL, 2005). Quando isso ocorre, inicia-se o

aparecimento de gônadas femininas, e em casos de temperaturas baixas, a enzima não tem expressão suficiente para o desenvolvimento ovariano, e, então, testículos surgirão (DESVAGES; PIEAU, 1992; GIRONDONT et al., 2010). Carvalho 2016 evidenciou que as enzimas citocromo P450, citocromo P450c17 e NADPH-citocromo P450-redutase estão presentes no testículo e epidídimo do *Kinosternon scorpioides* nos diferentes períodos climáticos e podem estar relacionados à síntese de testosterona.

Estudos da expressão do gene *SOX9* em camundongos demonstraram que o gene está expresso em baixos níveis nos primórdios gonadais femininos e masculinos e sua expressão persiste nas células de Sertoli, desaparecendo no tecido ovariano. Dados experimentais sugerem que o gene *SOX9* é um gene crítico para o desenvolvimento de gônadas masculinas em mamíferos, aves e répteis testudines (SPOTILA; SPOTILA; HALL, 1998; YAO; CAPEL, 2005).

O conhecimento dos hormônios e de suas propriedades permitem o entendimento da biologia reprodutiva, principalmente em espécies TSD, cujo o efeito hormonal possui íntima relação no desenvolvimento embrionário. Portanto, quaisquer efeitos que desencadeiem variações na temperatura podem alterar a resposta hormonal, a determinação sexual e a dinâmica das populações. As alterações climáticas e os numerosos poluentes químicos xenoestrogênicos são capazes de alterar a atividade estrogênica biológica, afetando principalmente os tecidos reprodutivos gonadais que são altamente sensíveis aos efeitos destes (DURANDO et al., 2016).

- **Expressão Gênica**

Os atuais mecanismos que iniciam a cascata de determinação sexual são diversos, muitos aspectos da determinação do sexo e, mais particularmente, a diferenciação gonadal, são notavelmente conservada entre grupos de vertebrados. Os genes implicados na determinação do sexo de mamíferos e na diferenciação gonadal, tais como *Sox9*, *Dmrt1*, *Mis*, *Sf1*, *Wnt4*, *Dax1* e *FoxL2* também foi encontrado em espécies de aves e répteis, incluindo répteis com TSD (FLEMING et al., 1999; GOVOROUN et al., 2004; KETTLEWELL et al., 2000; LOFFLER et al., 2003; MALDONADO et al., 2002; MURDOCK & WIBBELS, 2003b; SPOTILA et al., 1998; SMITH et al., 1999b; WESTERN et al., 1999, 2000).

Para o entendimento da TSD, alguns estudos têm sido conduzidos, produzindo as primeiras informações sobre a regulação genética desse processo. A expressão de genes como C16ORF62, CCT3, MMP2 e NFIB, NOTCH2 para *Trachemys scripta* (CHOJNOWSKI & BRAUN, 2012); DMRT1 em *Trachemys scripta* (MUDOCK & WIBBELS, 2003; KETTLEWELL et al., 2000); SF1, WT1 e DAX1 em Aligátor Americano (WESTERN et al., 2000); WT1 e SOX9 em *Trachemys scripta* (SPOTILA et al., 1998) tem sido relatada. Para esse tipo de estudo, a seleção de genes de referência é necessária para determinar o grau de estabilidade na expressão dos genes candidatos em todos os indivíduos. Para diversas espécies a padronização do uso desses genes já está disponível (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008; TENG et al., 2012), no entanto para espécies menos estudadas faz-se necessário sua padronização.

No período termo sensível (TSP), genes homólogos em animais GSD também desempenham papéis na determinação e diferenciação sexual de animais TSD. Os genes são Sf1, Aromatase, Wt1, Sox9, Mis, Dmrt1, Dax1, Wnt4, FoxL2, Fgf9 e Rspo1 (Ramsey et al., 2007; Shoemaker et al., 2007; Rhen et al., 2007; Smith, et al. 2008). Sox9 e Wt1 assumem papel no desenvolvimento dos testículos (Shoemaker et al., 2007). Aromatase e FoxL2 assumem papel no desenvolvimento de ovários (Ramsey et al., 2007; Valenzuela, 2008). Wnt4, Sf1 e Fgf9 assumem papel no desenvolvimento gonadal masculino e feminino (Ramsey et al., 2007; Rhen et al., 2007; Crews et al., 2007).

O padrão de expressão dos genes Sf1, Wt1, Aromatase, FoxL2, Sox9, Wnt4, Fgf9 e Rspo1 na gonada de embrião de *Chelonia mydas* foram aumentados durante o estágio de desenvolvimento gonadal e estudo sobre o nível de proteína também apoiou os resultados na expressão de genes respectivos (BRAILAN et. al., 2015). O DMRT-1 é outro gene de elevada expressão e requerimento durante o processo de diferenciação testicular em mamíferos e aves. Tal gene já foi identificado nas gônadas em diferenciação testicular de alguns répteis, porém ainda não em tartarugas marinhas (MALDONADO et al., 2002; WIBBELS, 2003). O gene SOX9 foi isolado em alta concentração em um estudo com tartarugas olivas em diferenciação gonadal testicular, e em baixa concentração em tartarugas em diferenciação gonadal para ovários (MALDONADO et al., 2002; WIBBELS, 2003).

Uma característica conservada da determinação do sexo dos vertebrados é a capacidade dos hormônios esteróides para influenciar tanto a Determinação Sexual Genotípica (exceto em mamíferos eutérios) como Determinação Sexual Dependente da Temperatura. Em muitos vertebrados, o estrogênio desempenha um papel proeminente na diferenciação dos ovários. A inibição de Cyp19a1 (aromatase P450), a enzima que converte a testosterona em estradiol (E2), durante o TSP, produz os filhotes masculinos de temperaturas tendenciosas femininas (CREWS & BERGERON, 1994).

O fator esteroidogénico 1 (Sf1), um gene conhecido por regular a expressão de enzimas esteroidogénicas gonadais incluindo a aromatase (MOROHASHI & OMURA, 1996). Sf1 é crucial na determinação e diferenciação do sexo dos vertebrados independentemente do mecanismo determinante do sexo. Além de suas funções esteroidogénicas, é fundamental para a manutenção da gônada bipotencial precoce e desempenha um papel crítico na diferenciação testicular.

Segundo Ramsey and Crews (2009), determinados genes podem estar relacionados com a expressão de característica em tartarugas com determinação sexual dependente da temperatura, uma vez que a mesma pode estar regulada de acordo com a quantidade do hormônio estrogênio no interior das gônadas. O aumento ou diminuição deste hormônio pode determinar, de acordo com a expressão de genes específicos, a produção de fêmeas e machos respectivamente.

Apesar de a temperatura da incubação ser reconhecidamente um fator que afeta a determinação sexual dos embriões, a taxa de estrógeno é um elemento ainda mais importante, pois embriões tratados com estrógeno geram fêmeas em temperaturas apropriadas ao desenvolvimento de machos e machos se desenvolvem quando a síntese de estrógeno é bloqueada em uma temperatura que tipicamente produz fêmeas (WIBBELS *et al.*, 1994; PIEAU, 1996). Mas como é a temperatura de incubação que regula a produção de estrógeno, deduz-se que no ambiente natural a temperatura da incubação é o elemento básico da determinação sexual (WIBBELS *et al.*, 1994).

Três hipóteses prováveis e complementares foram apresentadas para explicar como a TSD pode ser desencadeada. A primeira hipótese supõe-se que existem promotores sensíveis à temperatura que induzem ou reprimem a expressão de genes gonadais cujos produtos são reguladores das cascatas de genes e/ou vias bioquímicas que

determinam o destino gonadal (MERCHANT-LARIOS, 2001). A segunda hipótese elabora a existência de vias bioquímicas gonadais que se tornam sensíveis à temperatura de incubação por meio de intermediários metabólicos cujas concentrações celulares mudam dependendo da temperatura de incubação (JEYASURIA, & PLACE, 1998). O terceiro cenário hipotético exige a participação do sistema nervoso. Neste modelo, fibras nervosas sensitivas sensíveis à temperatura localizadas dentro das gônadas podem sinalizar informações térmicas e liberar neurotransmissores localmente após serem estimuladas (GUTIÉRREZ-OSPINA, 1999 E JIMÉNEZ-TREJO, et. al., 2011).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. H.; WELLS, K. D. **Herpetology**. 2º ed. New Jersey: Prentice all. 2001. 612p.
- ALHO, C. J. R.; DANNI, T. M. S. & PÁDUA, L. F. M. Temperature-dependent Sex Determination in *Podocnemis expansa* (Testudinata: Pelomedusidae). **Biotropica**, 17 (1): 7578, 1985.
- ALVAREZ DEL TORO, M. **Los Reptiles de Chiapas. Tercera Edicion**, Corregida y Aumentada. Instituto de Historia Natural, Tuxtla Gutierrez, Chiapas, México. 248 pp.1982.
- ANUNCIAÇÃO, A. R. A. Aspecto biológico e biométrico do desenvolvimento do jurará (*Kinosternon scorpioides*, Linnaeus, 1766) criado em cativeiro. **Monografia** (trabalho de conclusão de curso). Universidade Estadual do Maranhão. São Luis, 2013. 50 p.
- BARLIAN, A.; VANAWATI, N.; AYUNINGTYAS, F. D. The patterns of sex determination and differentiation genes in green sea turtle (*Chelonia mydas*). **Journal of Biological Researches**: 20 (15-20) 2015.
- BARRETO, L.; LIMA, L. C.; BARBOSA, S. Observations on the Ecology of *Trachemys adiutrix* and *Kinosternon scorpioides* on Curupu Island, Brazil. **Herpetological Review**, v.40, n.3, 283–286, 2009.
- BARSKE L.A., CAPEL B. Blurring the edges in vertebrate sex determination. **Cur Opin Genet Deve**. 18: 499-505, 2008.
- BERNHARD, R. Biologia reprodutiva de *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Pelomedusidae) na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil. **Dissertação de Mestrado**, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 59 Manaus, Amazonas. 52pp 2001.
- BERRY, J. F e SHINE, R. Sexual size dimorphism and sexual selection in turtles (order Testudines). **Oecologia**, 44 (2): 185-191.1980.
- BERRY, J. F. & IVERSON, J. B. *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) – Scorpion Mud Turtle. **Chelonian Research Foundation**, 5(1):063.1-063.15, 2011.
- BERRY, J. F., e IVERSON, J. B. *Kinosternon scorpioides*. **Catalogue of American Amphibians and Reptiles** 9725: 1-11.2001.
- BRITES, V. L. C.; FARIA, R. G.; MESQUITA, D. O.; COLLI, G. R. **The Herpetofauna of the Neotropical Savannas**, 2009.
- BRODERICK, A.C.; GODLEY, B.J.; REECE, S.; DOWNIE, J.R. Incubation periods and sex ratios of green turtles: highly female biased hatchling production in the eastern Mediterranean. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, 202: 273-281, 2000.

- BULL, J. J. & VOGT, R. C. Temperature-sensitive periods of sex determination in Emydid turtles. **Journal of Experimental Zoology**, 218: 435-440. 1981.
- BULL, J. J.; LEGLER, J. M.; VOGT, R. C. Non-temperature dependent sex determination in two suborders of turtles. **Copeia** 3:784-786, 1985.
- BULL, J.J. Sex determination in reptiles. **Q. Rev. Biol.**, 55:3-20, 1980.
- BULL, J.J.; VOGT, R.C. Temperature-dependent sex determination in turtles. **Science**, 206(7): 1186-1188. 1979.
- BURGER, J. Behavior of hatchling diamondback terrapins (*Malaclemys terrapin*) in the field. **Copeia**, 1976(4): 742-749. 1976b.
- CABRERA, M.R. & S.E. COLANTONIO. Taxonomic Revision of the South American Subspecies of the Turtle *Kinosternon scorpioides*. **Journal of Herpetology**. v.31, n.4, p.507-513, 1997.
- CAGLE, K. D.; PACKARD, G. C.; MILLER, K.; PACKARD, M. J. Effects of the Microclimate in Natural Nests on Development of Embryonic Painted Turtles, *Chrysemys picta*. **Functional Ecology** 7 (6): 653-660. 1993.
- CASTRO, A. B. Biologia reprodutiva e crescimento do muçua *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1776) em cativeiro. 2006. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2006. 101 p.
- CAVALCANTE, A.M.S.; SILVA, A.S.L.; BARRETO, U.H.A.; GUIMARÃES, C.D.O.; PALHA, M.D.C. Influência da temperatura na eclosão dos ovos de muçua (*Kinosternon scorpioides*). **Anais**. 9º Seminário Anual de Iniciação Científica. 2011
- CERIANI, S. & J. WYNEKEN. 2007. Comparative morphology and sex identification of the reproductive sistem in formalin- preserved sea turtle specimens. **Zoology** 141: 179-187
- CHARNIER, M. Action de la temperature sur la sex-ratio chez l'embryon d'*Agamma agama* (Agamidae, Lacertilien). **Soc. Biol. Ouest Afric.**, 160: 620-622, 1966.
- CHAVES, L. P. F. A. Morfologia dos órgãos genitais masculinos e níveis séricos de testosterona de jurará (*Kinosternon scorpioides*, Linnaeus, 1766) criado em cativeiro na região da baixada maranhense no estado do Maranhão. 2011. 92 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís: UEMA.
- CHOJNOWSKI, J. L. & BRAUN, E. L. Na unbiased approach to identify genes involved in development in a turtle with temperature-dependent sex Determination. **BMC Genomics**,13:308, 2012.
- CRASTZ, F. Embryological stages of the marine turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz). **Revista de Biologia Tropical**, v. 30, n. 2, p.113-120, 1982.

CREWS, D. AND BERGERON, J.M. Role of reductase and aromatase in sex determination in the red-eared slider (*Trachemys scripta*), a turtle with temperature-dependent sex determination. **Journal Endocrinology** 143:279–289, 1994.

CREWS, D., BULL, J.J., AND WIBBELS, T. Estrogen and sex reversal in turtles: a dose-dependent phenomenon. **Gen. Comp. Endocrinol.** 81: 357–364, 1991.

CROTHER, B. I. Evolutionary relationship. Pp.269-334.In: B. I. Crother (editor). **Caribbean Amphibians and Reptiles**. Academy Press, San Diego. 495 p. 1999

DELDUQUE. M. Ficha do Bicho; Muçã. **Globo Rural**. V. 176, p 1-4. 2000.

EHRENFIELD, D. W. Behavior associated with nesting. Pp. 417-434. I M. Harless and H. Marlock (Eds), **Turtles: Perspectives and Research**. John Wiley & Sons, New York. 1979.

ERNEST, C. H. e BARBOUR, R. W. **Turtles of the World**. Smithsonian Institute Press, Washington, D. C. e Londres.313 p. 1989.

EWERT, M.A.; ETCHEBERGER, C.R.; NELSON, C.E. Turtle sexdetermination modes and TSD patterns, and some TSD patterns correlates. In: Valenzuela, N.; Lance, V.A. Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates (Eds). **Smithsonian Books, Washington**. p. 21-32. 2004.

EWERT, M.A.; NELSON, C.E. Sex determination in turtles: Patterns and some possible adaptive values. **Copeia**, 50-69, 1991.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M.; BORGES, A. A.; BORGES-PÉREZ, A.; PÉREZ, J. A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **Bma Plant Biology**, 8:131, 2008.

FERREIRA JÚNIOR, P.D. Efeitos de Fatores Ambientais na Reprodução de Tartarugas. **Acta Amazonica**. vol. 46(2): 112 – 15. 2009b.

FERREIRA JÚNIOR, P.D. Influência dos processos sedimentológicos e geomorfológicos na escolha das áreas de nidificação de *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-amazônia) e *Podocnemis unifilis* (tracajá) na bacia do rio Araguaia. **Tese de Doutorado**, Departamento de Geologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, 296pp, 2003.

FERREIRA JÚNIOR, P.D.; CASTRO, P.T.A. Geological control of *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis* nesting areas in Rio Javaés, Bananal Island, Brazil. **Acta Amazonica**, 33(3): 445-468. 2003.

FERREIRA JÚNIOR, P.D.; GUIMARÃES, O.S.; MALVASIO, A. The influence of geological factors on reproductive aspects of *Podocnemis unifilis* (Testudines, Pelomedusidae), on the Javaés river, Araguaia National Park, Brazil. **Chel. Conserv**, 2002 a.

FERREIRA-JÚNIOR, P. D. Aspectos ecológicos da determinação sexual em tartarugas. **Acta Amazonica**, 39(1):139-154, 2009. *Biol.*, 4(3): 626-634. 2009.

FLEMING A, WIBBELS T, SKIPPER JK AND CREWS D. Developmental expression of steroidogenic factor 1 in a turtle with temperaturedependent sex determination. **General and Comparative Endocrinology**. 116 336–346, 1999.

FLORES-VILLELA, O. **Herpetofauna Mexicana**. Carnegie Museum of Natural History Special Publication (17): i-iv, 1-73.1993.

FONTENELE-NETO, D. J.; MORAIS, M. R. P. T.; VELHO, A. L. M. C. S; SANTAS, S. E. S. Morfofisiologia da reprodução das aves: desenvolvimento embrionário, anatomia e histologia do Sistema Reprodutor. **Acta Veterinária 6 (3)**: 165-176. 2012.

FREIBERG, M. A. Turtles of South America. TFH. Publications. **INC 211 West Sylvania Avenue**, Neptune City. N.J. 1981.

GETTINGER, R. D.; PAUKSTIS, G. L.; GUTZKE, W. H. N. Influence of hydric environment on oxygen consumption by embryonic turtles *Chelydra serpentina* and *Trionyx spiniferus*. **Physiol. Zool.** 57: 468-473. 1984.

GILBERT, S.F. Developmental Biology. **Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 7, USA**. 2003.

GOVOROUN MS, PANNETIER M, PAILHOUX E, COCQUET J, BRILLARD JP, COUTY I, BATELLIER F, COTINOT C. Isolation of chicken homolog of the Foxl2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. **Developmental Dynamics**. 231:859-870, 2004.

GREENBAUM, E. A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta*. **Canadian Journal of Zoology**. v. 80, p. 1350–1370, 2002.

GREENBAUM, E. e CARR, J. L. Staging criteria for embryos of the spiny softshell turtle, *Apalone spinifera* (Testudines: Trionychidae). **Journal of Morphology**, v. 254, p. 272–291, 2002.

GUTIÉRREZ-OSPINA, G., JIMÉNEZ-TREJO, F.J., FAVILA, R., MORENO-MENDOZA, N., GRANADOS-ROJAS, L., BARRIOS, F.A.; MERCHANT-LARIOS, H. Acetylcholinesterasepositive innervation is present at the undifferentiated stages of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* embryo gonads: Implications for temperature-dependent sex determination. **The Journal of Comparative Neurology**. 410, 90-98, 1999..

GUTZKE, W.H.N.; PAUKSTIS, G.L. Influence of the hydric environment of sexual differentiation of turtles. **J. Exp. Zool.**, 226: 467-469. 1983.

HAILMANN, J. P.; ELOWSON, A. M. Ethograms of the nesting female Loggerhead (*Caretta caretta*). **Herpetologica**, 48: 1-30.1992.

HALL, B.K. e MIYAKE, T. How do embryos measure time? In Evolutionary change and heterochrony. Edited by **K.J. McNamara**. John Wiley and Sons, New York. p. 3–20, 1995.

HAYS, G.C.; ASHWORTH, J.S.; BARNSLEY, M.J.; BRODERICK, A.C.; EMERY, D.R.; GODLEY, B.J.; HENWOOD, A.; JONES, E.L. The importance of sand albedo for the thermal conditions on sea turtle nesting beaches. **Oikos**, 93(1): 87-94, 2001.

HEAD, G.; May, R.M.; Pendleton, L. Environmental determination of sex in the reptiles. **Nature**, 329(6136): 1981-99. 1987.

HOUILLON, C. **Embriologia**. São Paulo: Edgar Blücher, 1972. p.3-80; 102-130

IVERSON, J. B. *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766). P. 65. In: F. W. King and R. L. BURKE (editors). Crocodilian, Tuatara, and Turtle Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference. **The Association of Systematics Collections, Washington, D. C.** 216 p. 1989.

JANZEN, F. J. e PAUKSTIS, G. L. Environmental sex determination in reptiles: ecology, evolution, and experimental design. **The Quarterly review of biology**. v. 66, n. 2, p. 149-79, 1991.

JANZEN, F.J.; KRENZ, J.G. Phylogenetics: which was first, TSD or GSD?. In: Valenzuela, N.; Lance, V.A. Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates (Eds). **Smithsonian Books**, Washington. p. 121-130. 2004.

JEYASURIA, P. & PLACE, A.R. Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivácea* aromatase (CYP19). **Journal of Experimental Zoology**, 281, 428-449, 1998.

KARDONG, K. V. 2011. **Vertebrados: Anatomia Comparada, Função e Evolução**. 5a ed. São Paulo. Roca.

KETTLEWELL, J. R.; RAYMOND, C. S.; ZARKOWER, D. Temperature-Dependent Expression of Turtle Dmrt1 Prior to Sexual Differentiation. **Genesis**, 26:174-178, 2000.

LESHEM, A. & DMI'EL, R. Water loss from *Trionyx triunguis* eggs incubating in natural nests. **Herpetological Journal** 1: 115–117. 1986.

LOFFLER KA, ZARKOWER D, KOOPMAN P. Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: *FOXL2* is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. **Endocrinology**. 144:3237- 3243, 2003.

MACIP- RÍOS, R. CISNEROS, M. L. A. AGUILAR-MIGUEL, X. S. CASAS-ANDREU, G. Population ecology and reproduction of the mexican mud turtle (*Kinosternon integrum*) in the tonatico, estado do méxico. **Western North American Naturalist** v.69 n.4 p 501-510. 2009.

MACIP-RÍOS, R.; SUSTAITA-RODRÍGUEZ, V.H.; BARRIOS-QUIROZ, G.; CASAS-ANDREU, G. Alimentary habits of the Mexican Mud Turtle (*Kinosternon integrum*) in Tonatico, Estado de México. **Chelonian Conservation and Biology**, 9: 90-97, 2010.

MAGALHÃES, M. S. Desenvolvimento embrionário de *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae): descrição do pronefro e mesonefro e diferenciação gonadal em ambiente natural, Balbina, Amazonas. 2017. 134 f. **Tese** (Doutorado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2017.

MALDONADO LCT, PIEDRA AL, MENDOZA NM. Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). **Gen Comp Endocrinol**, v.129, p.20-26, 2002.

MALVASIO, A.; GOMES, N.; FARIAS, E. C. 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, 1999.

MANOLAKOU. P, LAVRANOS. G, ANGELOPOULOU, G. Molecular patterns of sex determination in the animal kingdom: a comparative study of the biology of reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 4, p. 1-23, Nov. 2006.

MARCOVALDI, M.A.; GODFREY, M.H.; MROSOVSKY, N. Estimating sex ratios of loggerhead turtles in Brazil from pivotal incubation durations. **Can. J. Zool.**, 75: 755-770. 1997.

MCGEADY, T. A., QUINN, P. J., FITZPATRICK, E. S. & RYAN, M. T. **Veterinary Embryology**. Blackwell Publishing, Oxford: 392. 2006.

MERCHANT-LARIOS, H. Temperature sex determination in reptiles: The third strategy. **Journal of Reproduction and Development**, 47, 245-252, 2001.

MILLER, K.; PACKARD, G. C.; PACKARD, M. J. Hydric conditions during incubation influence locomotor performance of hatchling of snapping turtles. **J. Exp. Bio.**, 127: 401-412. 1987.

MILTON, S.L.; SCHULMAN, A.A.; LUTZ, P.L. The effect of beach nourishment with aragonite versus silicate sand on beach. 1997.

MOLINA, F. B. & LISBOA, C. S. (2007). Muçua. Zoológico de São Paulo, São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Disponível em: <<http://www.zoologico.sp.gob.br/repteis/mucua.htm>>. Acesso em: 10 de outubro de 2018.

MOLINA, F. B. O comportamento reprodutivo de quelônios. **Biotemas**, v. 5, n.2, p.61-70, 1992.

MOORE, K. L & PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Básica**. Elsevier Brasil. 2008.

MOROHASHI KI, OMURA T. "Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of steroidogenic cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function". *FASEB Journal*. 10 (14): 1569–77, 1996.

MURDOCK, C. & WIBBELS, T. Expression of Dmrt1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Cytogenet Genome Research*, 101:302-308, 2003.

NARO-MACIEL, E.; MROSOVSKY, N.; MARCOVALDI, M.A. Thermal profiles of sea turtle hatcheries and nesting areas at Praia do Forte, Brazil. *Chel. Conserv. Biol.*, 3(3): 407-413. 1999.

OKADA, Y.; YABE, T. e ODA S–I. Embryonic development of the Japanese pond turtle, *Mauremys japonica* (Testudines: Geoemydidae). *Curr Herpetologica*, v. 30, p. 89–102, 2011.

PACKARD, G.C.; PACKARD, M.J. Water relations of embryonic snapping turtles (*Chelydra serpentina*) exposed to wet or dry environments at different times in incubation. *Physiol. Zool.*, 61(1): 95-106. 1988.

PEREIRA, L. A.; SOUSA, A. L.; CUTRIM, M. V. J.; MOREIRA, E. G. Características ecológicas do habitat de *Kinosternon scorpioides scorpioides* Linnaeus, 1766 (Reptila, Chelonia, Kinosternidae) no município de São Bento- Baixada maranhense (Maranhão, Brasil). *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*, 20:9-14, 2007.

PEREIRA, L. A.; SOUSA, A. L.; LEMOS, J. J. S. (2007). Extrativismo de jurará (*Kinosternon scorpioides scorpioides*) Linnaeus, 1766 ( Reptila, Chelonia, Kinosternidae) e avaliação sócio ambiental dos pescadores no município de São Bento - MA. In: Alessandro Costa da Silva e Jorge Luiz de Oliveira Fortes. (Org.). *Diversidade Biológica e uso e conservação de recursos naturais no Maranhão. Projeto e ações em Biologia e Química*. 1ed. São Luís: EDUEMA, v. 2, p. 263-299, 2007.

PETOKAS, P.J.; ALEXANDER, M.M. The nesting of *Chelydra serpentina* in northern New York. *J. Herpetol.*, 14: 239-244. PIEAU, C. 1996. Temperature variation and sex determination in reptiles. *Bio Essays*, 18(1): 19-26. 1980.

PEZZUTI, J.C.B.; VOGT, R. Nesting ecology of *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Pelomedusidae) in the Japurá River, Amazonas, Brazil. *Chel. Conserv. Biol.*, 3(3): 419-424. 1999.

PIEAU, C. Sur la proportion sexuelle chez les embryons de deux chéloniens (*Testudo graeca* L. *Emys orbicularis* L.) issus. d’oeufs incubés artificiellement. *C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sci Paris*, 272D: 3071-3074. 1971.

PIEAU, C. Temperature variation and sex determination in reptiles. *Bio Essays*, 18(1): 19-26, 1996.

PIEAU, C., DORIZZI, M. AND RICHARD-MERCIER, N. Temperature- dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cell Mol Life Sci* 55:887–900, 1999.

PIEAU, C.; MROSOVSKY, N. Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. **Amphibia-reptilia**, v. 12, p. 169-179, 1991.

PLUMMER, M.V.; SHADRIX, C.E.; COX, R.C. Thermal limits of incubation in embryos of softshell turtles (*Apalone mutica*). **Chel. Conserv. Biol.**, 1: 141-144. 1994.

POUGH, F. H.; ANDREWS, R. M.; CADLE, J. E.; CRUMP, M.L.; SAVITZKY,

PRITCHARD, P. C. H.; TREBBAU, P. The turtles of Venezuela. Society the Study of Amphibians and Reptiles. **Ithaca** 403 p. 47 plates, 6 maps 1984.

RAMSEY, M.; CREWS, D. D. Steroid Signaling and Temperature-Dependent Sex Determination– Reviewing the Evidence for Early Action of Estrogen during Ovarian Determination in the Red-Eared Slider Turtle (*Trachemys scripta elegans*). **Semin Cell Dev Biol.** 20(3): 283–292, 2009.

RAMSEY, M.; SHOEMAKER, C.; CREWS, D. Gonadal expression of Sf1 and aromatase during sex determination in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*), a reptile with temperature-dependent sex determination. **Differentiation**, 75(10):978-991, 2007.

RAYNAUD, A., AND C. PIEAU. Embryonic development of the genital system. **In: Biology of the Reptilia**. C. Gans and F. Billet, eds. J. Wiley and Sons, New York, pp. 149–300, 1985.

ROCHA, M. B. e MOLINA, F.B. Reproductive biology of *Kinosternon scorpioides* (Testudines: Kinosternidae) in captivity. **Tortoises and Turtles**. 1990.

RODRIGUES, C. A. L. Biologia do desenvolvimento da tartaruga semi-aquática *Kinosternon scorpioides* (Testudines, Kinosternidae): validação do gene de referência Protein Phosphatase 1 (PP1). **Dissertação (Mestrado)** – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 69 f, 2015.

RUEDA-ALMONACID, J. V.; CARR, J. L.; MITTERMEIER, R. A.; RODRÍGUEZ-MAHECHA, J. V.; MAST, R. B.; VOGT, R. C.; RHODIN, A. G. J.; De La OSSA, V. J.; RUEDA, J. N.; MITTERMEIER, C. G. Las tortugas y los crocodilia de los países andinos del Trópico: Manual para su identificación. Bogotá, Colômbia: **Conservation International**, 2007.

SANDRA G-E., NORMA M-M. Sexual determination and differentiation in teleost fish. **Rev Fish Biol Fisheries**, 20: 101-121, 2010

SANTOS, E. Anfíbios e répteis do Brasil. **Zoologia Brasileira**, 1981.

SCHWARTZ, A. E HENDERSON, R. W. Amphibians and Reptiles of the West Indies: Descriptions, Distributions, and Natural History. University of Florida Press, **Gainesville**. 720 p 1991.

SILVA, A. S. L. Aspectos reprodutivos do muçã (*Kinosternon scorpioides*) em cativeiro. 95 f. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011.

SILVA, A. S. L.; PALHA, M. D. C.; RIBEIRO, A. S. S.; ARAÚJO, J. C.; BASTOS, P. C. R.; CASTRO, A. B. e OLIVEIRA, F. A. O. Desempenho reprodutivo de muçãs (*Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766) mantidos em cativeiro sob distintas dietas. **In**: Congresso Internacional sobre Manejo e Fauna Silvestre na Amazônia e América Latina, 7., 2006, Ilhéus. Resumos...Ilhéus: UESC, 2006.

SMITH CA, SMITH MJ, SINCLAIR AH. Expression of chicken steroidogenic factor-1 during gonadal sex differentiation. **General and comparative endocrinology** 113:187-196, 1999b.

SOUZA, R.R.; VOGT, R.C. Incubation temperature influences sex and hatchling size in the neotropical turtle *Podocnemis unifilis*. **J. Herpetol.**, 28(4): 453-464. 1994.

SPOTILA, L. D.; SPOTILA J. R.; HALL S. E. Sequence and Expression Analysis of Wt1 and Sox9 in the Red-Eared Slider Turtle, *Trachemys scripta*. **Journal of Experimental Zoology**, 281:417–427. 1998.

TENG, X.; ZHANG, Z.; HE, G.; YANG, L.; LI, F. Validation of Reference Genes for quantitative Expression Analysis by Real-Time RT-PCR in Four Lepidopteran Insects. **Journal of Insect Science**, 12:60, 2012.

THOMPSON, M.B. Nest temperatures in the Pleurodian Turtle, *Emydura macquarii*. *Copeia*, 1988(4): 996-1000. 1988b.

TOKITA, M.; KURATANI, S. Normal embryonic stages of the Chinese Softshelled turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae). **Zoological Science**, v. 18, p. 705-715, 2001.

VALENZUELA N. Constant, Shift, and Natural Temperature Effects on Sex Determination in *Podocnemis expansa* turtles. **Ecology**, 82(11):3010-3024, 2001.

VALENZUELA, N. Temperature-dependent sex determination and ecologic genetics of the Amazonian river turtle *Podocnemis expansa*. **Chaptrs**, v.9, p.65, 2004.

VALENZUELA, N.; BOTERO, R.; MARTÍNEZ, E. Field study of sex determination in *Podocnemis expansa* from Colombian Amazonia. *Herpetologica*, 53(3): 390-395. 1997.

VALENZUELA, N.; LANCE, V.A. Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates (Eds). **Smithsonian Books**, Washington, 194p. 2004.

VAN DIJK, P. P. V.; IVERSON, J. B.; RHODIN, A. G. J.; SHAFFER, H. B.; BOUR, R. Turtles of the World, 7th Edition: Annotated Checklist of Taxonomy, Synonymy, Distribution with Maps, and Conservation Status. **Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises – Chelonian Research**. n. 5,p.329-479, 2014.

VANZOLINI, P. E.; RAMOS-COSTA, A. M. M.; BIT, L. J. **Répteis das caatingas**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, Brasil, 1980. 140p.

VIEIRA, L. G. Desenvolvimento embrionário de *Melanosuchus niger* (Crocodylia, Alligatoridae): Descrição de estágios e ontogenia do esqueleto. **Dissertação** (mestrado) –Instituto de Ciências Biológicas Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, 161f, 2011.

VOGT, R. C. **Amazon Turtles**. 1. Ed. Lima: Biblos, v. 1. P. 104, 2008.

VOGT, R. C.; FAGUNDES, C. K.; BATAUS, Y. S. L.; BALESTRA, R. A. M.; BATISTA, F. R. W.; UHLIG, V. M.; SILVEIRA, A. L.; BAGER, A.; BATISTELLA, A. M.; SOUZA, F. L.; DRUMMOND, G. M.; REIS, I. J.; BERNHARD, R.; MENDONÇA, S. H. S. T.; LUZ, V. L. F. 2015. Avaliação do Risco de Extinção de *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. ICMBio. <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/estado-de-conservacao/7407-repteis-kinosternon-scorpioides-mucua.html>).

VOGT, R.C.; BULL, J.; MCCOY, C.J.; HOUSEAL, T.W. Incubation temperature influences sex determination in kinosternid turtles. **Copeia**, 1982(2): 480-482, 1982.

WEISROCK, D.W.; JANZEN, F.J. Thermal and fitness-related consequences of nest location in Painted Turtles (*Chrysemys picta*). **Funct. Ecol.**, 13(1): 94-101. 2000.

WERNEBURG, I. A standard system to study vertebrate embryos. **PLoS ONE**. v. 4, n. 6, p.16, 2009.

WERNEBURG, I.; HUGI, J.; MULLER, J.; SÁNCHEZ-VILLAGRA, M. R. Embryogenesis and ossification of *Emydura subglobosa* (Testudines, Pleurodira, Chelidae) and patterns of turtle development. **Developmental Dynamics**. v. 238, p. 2770–2786, 2009.

WESTERN PS, HARRY JL, GRAVES JAM, SINCLAIR AH. Temperature dependent sex determination: Upregulation of *Sox9* expression after commitment to male development. **Developmental Dynamics**. 214:171-177,1999.

WESTERN PS, HARRY JL, GRAVES JAM, SINCLAIR AH. Temperature-dependent sex determination in the american alligator: Expression of *Sfl*, *Wtl*, and *Dax1* during gonadogenesis. **Gene**. 241:223-232, 2000.

WHITE, R.B.; THOMAS, P. Stimulation of in vitro steroidogenesis by pituitary hormones in a turtle (*Trachemys scripta*) within the temperature-sensitive period for sex determination. **Biol. Reprod.** v. 47, p. 952–959, 1992.

WIBBELS T. Critical approaches to sex determination in sea turtles. **In: Lutz PL, Musick JA, Wyneken, J. (Ed.)**. The biology of sea turtle II. Boca Raton, FL: CRC Press, 2003. p.103-133.

WIBBELS, T., BULL, J.J. e CREWS, D. Temperature-dependent sex determination: a mechanistic approach. **J Exp Zool**, 270:71–78, 1994.

WILSON, D.S. Nest-site selection: microhabitat variation and its effects on the survival of turtle embryos. **J. Herpetol.**, 22(1): 88-96. 1998.

YAO, H. H.-C.; CAPEL, B. Temperature, genes, and sex: a comparative view of sex determination in *Trachemys scripta* and *Mus musculus*. **Journal Biochemical**, v. 138, n. 1, p. 5-12, 2005.

YNTEMA, C. L. & MROSOVSKY, N. Sexual Differentiation in Loggerheads (*Caretta caretta*) Incubated at Different Controlled Temperatures. **Herpetologica**, 36(1):33-36, 1980.

YNTEMA, C. L. A series of Stages in the Embryonic Development of *Chelydra serpentina*. **Journal of Morphology**. v.125, p. 219-252, 1968.

YNTEMA, C.L. Effects of incubation temperatures on sexual differentiation in the turtle, *Chelydra serpentina*. **Journal of Morphology**., 150(2): 453-462, 1976.

YNTEMA, C.L. Temperature levels and periods of sex determination during incubation of eggs of *Chelydra serpentina*. **J. Morphology**., 159(1): 17-28, 1979.

**CAPÍTULO II: ESTÁGIO EMBRIONÁRIO DE *Kinosternon scorpioides*  
(TESTUDINES, KINOSTERNIDAE)**

---

## ESTÁGIO EMBRIONÁRIO DE *Kinosternon scorpioides* (TESTUDINES, KINOSTERNIDAE)

Lianne Pollianne Fernandes Araujo Chaves<sup>1</sup>; Ligia Tchaicka<sup>2</sup>; Alana Lislea de Sousa<sup>3</sup>

1 Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, da Universidade Federal do Maranhão-UFMA. 2 Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, Universidade Estadual do Maranhão, UEMA. 3 Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão/UEMA, Campus Paulo VI, Tirirical, São Luís, Maranhão, Brasil

### RESUMO

Descreve-se a biologia do desenvolvimento embrionário do *K. scorpioides*, com base no fenótipo uma vez que a espécie possui importância para a fauna silvestre maranhense associada a informações embriológicas básicas a fim de proporcionar uma maior compreensão do manejo reprodutivo. Fêmeas foram acompanhadas ao longo do ciclo reprodutivo, por videomonitoramento, para identificação de ninhos e de presença de ovos recém-postos. Em intervalos regulares semanais, amostras de embriões foram coletos; fixados em solução de paraformol 4% e conservados em álcool 70%. Para caracterização do embrião utilizamos um estereomicroscópio e o método de microscopia eletrônica de varredura. Descrevemos 15 estágios embrionários com ciclo de desenvolvimento de 15 semanas (105 dias). Somente aos 42 dias (6ª semana) percebeu-se a caracterização morfológica de um quelônio e na 12ª semana (Estágio XII) a caracterização fenotípica da espécie *K. scorpioides*. Diante das características evidenciadas, as fases do desenvolvimento embrionário assemelharam aos demais quelônios e as características fenotípicas sofrem variações estruturais no surgimento e desaparecimento de estruturas devido as características específicas descritas.

**Palavras-chave:** Reprodução, embriologia, *cágado*, tartaruga da lama.

# STAGES OF EMBRYONIC DEVELOPMENT OF THE AMAZONIAN TURTLE

*Kinosternon scorpioides* (TESTUDINES, KINOSTERNIDAE)

Lianne Pollianne Fernandes Araujo Chaves<sup>1</sup>; Ligia Tchaicka<sup>2</sup>; Alana Lislea de Sousa<sup>3</sup>

1 Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, da Universidade Federal do Maranhão-UFMA. 2 Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, Universidade Estadual do Maranhão, UEMA. 3 Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão/UEMA, Campus Paulo VI, Tirirical, São Luís, Maranhão, Brasil

## ABSTRACT

The embryo developmental biology of *K. scorpioides* is described, based on the phenotype since the species is important for the wild fauna of Maranhão associated with basic embryological information in order to provide a greater understanding of reproductive management. Females were monitored throughout the reproductive cycle, by video monitoring, to identify nests and the presence of newly laid eggs. At regular weekly intervals, embryo samples were collected; fixed in 4% paraformol solution and preserved in 70% alcohol. To characterize the embryo, we used a stereomicroscope and the scanning electron microscopy method. We describe 15 embryonic stages with a 15-week development cycle (105 days). Only at 42 days (6th week) was the morphological characterization of a chelonian noticed and at the 12th week (Stage XII) the phenotypic characterization of the species *K. scorpioides*. In view of the evidenced characteristics, the phases of embryonic development resembled the other chelonian and the phenotypic characteristics undergo structural variations in the appearance and disappearance of structures due to the specific characteristics described.

**Keywords:** Reproduction, embryology, tortoise, scorpion mud turtle.

## 1. INTRODUÇÃO

Investigações sobre a reprodução de quelônios são fundamentais para assegurar sustentabilidade, conservação e estabelecimento de planos de manejo reprodutivo. Apesar da longevidade dos Jabutis, cágados e tartarugas de águas doce e salgada, eles ainda apresentam baixas taxas de crescimentos, podendo ocasionar declínio populacional e até mesmo extinção por ações de caça, desmatamento e alterações ambientais, uma vez, que elas antecedem a eclosão, e momentos críticos durante a incubação natural dos ovos. Estes fatores não favorecem a maturidade para o nascimento, ocasionando aumento da mortalidade, reduzindo o recrutamento de jovens na manutenção da população (Ferreira Júnior, 2009).

O estabelecimento dos estágios embrionários em répteis são definidos de acordo com o aparecimento das características morfológicas externas ao longo do desenvolvimento. Sendo elas, consideradas critérios para o reconhecimento diferencial de cada estágio (Vieira et al., 2016). Fatores como temperatura, umidade e oxigenação são variáveis importantes na embriogênese dos quelônios, pois influenciam diretamente a taxa de desenvolvimento, duração da incubação, tamanho dos filhotes, metabolismo, comportamento e principalmente a determinação sexual (Gettinger et al., 1984; Bull, 1985; Leshem & Dmi'el, 1986; Miller et al., 1987; Cagle et al., 1993; Greenbaum, 2002; Okada et al., 2011).

Algumas espécies da ordem Testudines tiveram seus estágios embrionários determinados: *Chelydra serpentina* (Yntema, 1968); *Lepidochelys olivacea* (Crastz, 1982); *Pelodiscus sinensis* (Tokita & Kuratani, 2001); *Trachemys scripta* (Greenbaum, 2002); *Emydura subglobosa* (Werneburg et al., 2009); *Podocnemis expansa* (Magalhães,

2017). Entretanto, a espécie *K. scopioides*, tem de forma inédita, a descrição biológica das fases do desenvolvimento embrionário..

Com ampla distribuição geográfica o *K. scopioides* é uma tartaruga semi-aquática, da família Kinosternidae, integrante da fauna silvestre amazônica. Encontra-se presente nas regiões norte e nordeste do Brasil, nos Estados do Amazonas, Pará, Amapá, Rondônia, Mato Grosso, Maranhão, Tocantins, Goiás e Minas Gerais (Vogt et al., 2015). Dados biológicos sobre esta espécie, vem sendo investigados a anos por estudiosos maranhenses, principalmente sobre a sua biologia reprodutiva (Sousa et al., 2014; Viana et al., 2016; Chaves et al., 2020).

A importância que a espécie possui para a fauna silvestre amazônica, associada as informações embriológicas em um contexto de exploração racional sustentam este estudo que tem como objetivo, descrever os estágios embrionário da espécie, com base na descrição fenotípica, a servir de referencial na padronização de cada evento embriológico, a propiciar compreensão do manejo reprodutivo na elaboração de medidas eficientes de proteção em ambiente natural, bem como ao desenvolvimento de projetos de estímulo a criação em cativeiro para fins zootécnico e comercial amparada em leis ambientais.

## **2. MATERIAL E MÉTODO**

### **2.1 Animais**

Os animais pertencem ao Criadouro Experimental para a espécie *Kinosternon scopioides* (Licença IBAMA N° 1899339/2008), em São Luís-MA (02° 31' 47" S 44° 18' 10" W). Foram videomonitorados um lote de 19 fêmeas e 7 machos, adultos sexualmente maduros (idade acima de 3 anos e comprimento médio de carapaça de 14 cm). Observações *in loco* diariamente para a identificação de cópula, nidificação e

postura, além de acompanhamento radiográfico e ultrassonográfico das fêmeas eram realizados, para identificar presença de ovos nos ovidutos. Todo o manejo foi autorizado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade-ICMBio/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA-MA) com o licenciamento SISBIO pra coleta “*in situ*” dos animais sob nº 47635-4/2016 e também pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEAA) da UEMA sob nº 57/2017.

## **2.2 Coleta de ovos e embriões**

Amostras de ovos, após postura, ao longo de 12 meses, eram armazenados em incubadoras artificiais para répteis (Jaeger, Alemanha) com controle de temperatura média a 28°C. O desenvolvimento embrionário foi descrito a partir de cinco exemplares de ovos, em intervalos regulares de 1 semana, totalizando 75 amostras. Com base na ciência do Bem Estar Animal, embriões, a partir de 21 dias, eram eutanasiados com infiltrado diretamente no ovo com solução de tiopental sódico (20mg/kg) (Carpenter, 2006), enquanto aqueles nos estágios acima de (56 dias) eram administrados, o mesmo anestésico na cavidade celomática (100mg/kg) (AVMA Panel on Euthanasia., 2013).

## **2.3 Descrição dos estágios embrionário**

Para a descrição do desenvolvimento embrionário, baseamos no surgimento de características morfológicas externas, observadas ao estereomicroscópio (LEICA EZ4) e as imagens registradas com câmera fotográfica (SonyDSC Modelo, 16,2 Mega pixels).

Os embriões coletados foram fixados em Paraformol 4% por um período de 48 horas, conservados em álcool 70% e desidratados em séries crescentes de álcool (80, 90 e 100%), secos em estufa de CO<sub>2</sub> (24°C), colados em suporte (stub). Sequencialmente o

recobrimento metálico com ouro por — sputtering e observados no aparelho de microscopia de varredura modelo ME Leo 435 VP para análise e caracterização das estruturas.

### **3. RESULTADO**

O período médio de incubação para a espécie *Kinosternon scorpioides*, submetidos a incubação com temperatura média controlada de 28°C foi de 105 dias (15 semanas) o que permitiu identificar 15 estágios do desenvolvimento, tomando como base, os estudos de Ytema (1968) para a tartaruga *Chelydra serpentina*. As descrições deste estudo baseou-se nas características morfológicas de formação do olho, processo mandibular, membros e do escudo dérmico, as quais serviram de base na comparação a outras espécies de quelônios aquáticos (Tabela 1).

#### **3.1 Cabeça e desenvolvimento axial**

Caracterizamos o estágio I (7 dias) pelo formação do disco embrionário, vitelo e o albúmen (Fig. 1A), nesta fase ainda não estava visível o embrião. A partir do estágio II (14 dias) era percebido a organização dos tecidos na formação dos sistemas, evidenciando o coração primitivo e a formação dos vasos sanguíneos, e o surgimento das vesículas cerebrais, ópticas, arcos faríngeos e curvatura da coluna (Fig. 1B e 4A). No estágio IV (28 dias), a flexão corporal era evidente e contínua, com o embrião apresentando a forma de arco. Processo de formação da cabeça e região cefálica com quatro vesículas cerebrais, percebendo-se a organização do sistema nervoso. A vesícula óptica definida com retina pigmentada, fissura coroíde e pupila (Fig. 1D). No estágio V (35 dias) é notável a formação da cabeça com placódio óptico definido com retina e íris completamente pigmentada e fissura coroíde como uma linha, além do processo maxilar estendendo-se

próximo aos olhos e fusionados ao processo fronto- nasal. Em *K. scorpioides* a pálpebra inferior começa a se formar no estágio VI (42 dias), enquanto que a pálpebra superior aparece no estágio VII (49 dias) e ambas estão formadas e cobrem a maior parte do olho no estágio IX (63 dias) (1G, 2A, 3D e 4G), destacamos que os órgãos da visão ganham notabilidade. A formação da carúncula, estrutura que auxilia na abertura da casca do ovo é um processo observado e são determinantes para o processo de eclosão. É observada no estágio VIII (56 dias), momento que o maxilar e a mandíbula estão formados e permanece até o estágio XV (105 dias/nascimento), quando este mecanismo auxilia na quebra da casca do ovo (Fig 4F e I). Os escudos dérmicos da carapaça e do plastrão do *K. scorpioides* encontram-se totalmente formados a partir de 70 dias (estágio X), evidenciando completamente a característica da espécie. Esta estrutura formará o exoesqueleto protetor das vísceras (Fig.2B). Essas características foram observadas no terço final do desenvolvimento, a partir de 84 dias (Estágio XII). A coloração da carapaça a princípio é fortemente escura, com machas levemente amarelada nas bordas com plastrão negro ao centro e levemente amarelado nas extremidades (Fig 2E e F).

### **3.2 Desenvolvimento apendicular**

O aparecimento, dos brotos a originar os membros torácico e pélvico ocorreram simultaneamente no estágio III (21 dias), sendo que no estágio IV (28 dias) os brotos dos membros torácicos apresentavam-se maior e mais cranial que os pélvicos (Fig. 1C e D, 3A e 4B). No estágio V (35 dias) uma delimitação no tronco, por um sulco longitudinal mostra o início da formação da carapaça (Fig. 1E, 3B e 4C) bem definida no estágio VI (42 dias), e ainda em contínuo crescimento com marcante característica dos membros, e pigmentação da pele de cor cinza e surgimento das placas digitais evidenciando a forma

peculiar da ordem Chelonia (Fig. 1F, 3C e 4D). Aos 42 dias (estágio VI) os membros apresentam placas digitais, aos 49 dias (estágio VII) tem-se as placas digitais e os dígitos formando aspecto serrilhado na borda dos membros, aos 56 dias (estágio VIII) os cinco dígitos estão separados pelas membranas interdigitais e aos 70 (estágio X) e 98 dias (estágio XIV), eles estão completamente formados com as garras, dobras cutâneas e escamas (Fig. 3C- 3I).

### **3.3 Diferenciação sexual macroscópica**

A papila urogenital, estruturas que no indivíduo adulto será modificada para diferenciação sexual, determinando o sexo, foi observada a partir de 56 dias (estágio VIII), começando a ser envolvida pela estrutura cloacal aos 63 dias (estágio IX) e aos 84 dias (estágio XII) a cloaca está em formação (fig. 1H, 2A e D). A caudal é curta e a partir dos 70 dias (estágio X) observa-se a formação de um apêndice córnea na extremidade, que dá o nome para a espécie. No estágio XV (105 dias) caracteriza-se a eclosão com o nascimento. O padrão fenotípico da espécie é marcante, porém, não há diferenciação do dimorfismo sexual. Todos os nascidos eram semelhantes, com cabeça em forma triangular cinza escuro com manchas amarela e rostralmente o focinho alongado bem definido. Pescoço com pregas cutâneas de coloração cinza ou negra. Presença de três pares de barbelas mentonianas. A carapaça com trinta e seis placas dérmicas (nucal, vertebrais, costais e marginais) enquanto o plastrão recoberto externamente por seis pares de escudos córneos denominados gular, umerais, peitorais, abdominais, femorais e anais. Membros torácicos e pélvicos com membranas interdigitais reduzidas com cinco dedos com unhas pontiagudas. Pedúnculo vitelínico fechado e marcado por anel central no plastrão e um pequeno saco vitelínico pode estar persistente (Fig. 2G). A caudal é do mesmo tamanho para todos os recém eclodidos, não apresentando dessa forma dimorfismo sexual.

#### 4. DISCUSSÃO

Os embriões de *K. scorpioides* podem ser distinguidos de outras espécies por seu padrão fenotípico de pigmentação, características da quilha longitudinal da carapaça, escudos dérmicos do exoesqueleto, formado pela junção da carapaça com o plastrão. Comparações sobre o desenvolvimento, entre as espécies de quelônios, é algo ainda complexo, devido diferenças de tamanho e tempo envolvidos nas fases embrionárias (Greembaum & Carr, 2002). O uso de medidas de tamanho corporal, idade cronológica e estágio morfológico são ferramentas utilizadas para padronizar essas comparações interespecíficas (Hall & Miyake, 1995). Tradicionalmente, dois “modelo de teste” têm sido usadas para Testudines, os de Yntema (1968) e Miller (1985). Eles servem de base aos estudos realizados que descreveram a embriologia do desenvolvimento de tartarugas, e neles há diferenças no desenvolvimento entre as espécies.

O aparecimento da carapaça dos quelônios é um elemento variável entre as espécies, tanto nos estágios do desenvolvimento, bem como na morfologia e coloração. Aos 42 dias (Estágio VI) a carapaça do embrião de *K. scorpioides*, encontra-se definida, com o início da formação do plastrão, em um padrão característico das tartarugas. Estes são achados concordantes a outras espécies de tartarugas, como as marinhas *Chrysemys picta* e *Chelonia mydas*, em estudos semelhantes a este, surgindo entre os 22 e 28 dias de incubação, tempo este inferior, mas atribuído ao menor tempo de incubação (Andrews, 2004).

A formação inicial dos olhos é iniciada pelo aparecimento da vesícula óptica, destacando se o aparelho visual de forma marcante após o desenvolvimento da retina, íris, pupila e pálpebras inferiores e superiores. A vesícula óptica é claramente visível em *P. expansa* no estágio 6 (6 dias), enquanto a vesícula óptica é visível no estágio 7 (9 dias)

em *C. serpentina* (Yntema 1968) e *Mauremys japonica* (Okada et al. 2011) e no estágio 8 (4 dias) em *Pelodiscus sinensis* (Tokita & Kuratani, 2001).

Na tartaruga vermelha (*Emydura subglobosa*), a pálpebra inferior aparece precocemente, por volta do 13º dia (estágio 5) e já começa a sobrepor ao olho, atingindo o nível de lente (Werneburg et al., 2009). Neste aspecto, em tartaruga *C. serpentina* estas características foram observadas aos 30 dias de desenvolvimento e aos 20 dias em *P. sinensis* (Yntema, 1968; Tokita & Kuratani 2001). Em *M. japonica* (tartaruga de pedra), a carúncula foi evidenciada inicialmente como pequeno processo branco sob a narina (estágio 17), apresenta-se pontiaguda no estágio 26, característica peculiar da espécie (Okada et. al., 2011). Aos 63 dias (Estágio IX) observa-se a ranfoteca revestindo os ramos da mandíbula juntamente com a formação da barbel na região ventral da mandíbula (Fig 2A e 4D). Ela auxilia os animais a selecionar, despedaçar e ingerir seus alimentos em substituição aos dentes. Apresenta características próprias que variam conforme a dieta, podendo, desta forma, ser utilizada para identificar as diferentes espécies de tartarugas (Wyneken, 2001).

Diferentemente da descrição de Greembaum (2002), para *Trachemys scripta*, que fundamentou-se apenas nas características dos membros torácicos como critério para delimitar os estágios. Em *K. scorpioides* aprofundamos a caracterização das várias fases do desenvolvimento partindo da fase inicial a eclosão. Para Greenbaum (2002) a morfologia dos membros torácicos é o principal critério para a delimitação dos estágios, pois é facilmente analisada até a segunda metade do desenvolvimento, e é altamente conservada entre a maioria das tartarugas. A tendência no desenvolvimento dos membros é que os torácicos antecedam os pélvicos, acontecimento descritos nas espécies (*Chelydra serpentina*, *Pelodiscus sinensis*, *Emydura. subglobosa* e *M.japonica*), ou ambos

manifestam-se simultaneamente e sincronicamente (*Podocnemis expansa* e *Chrysemys picta*) (Tokita & Kuratani 2001).

O dimorfismo sexual dos adultos de *K. scorpioides* é marcante, com os machos apresentando cauda comprida e plastrão côncavo e as fêmeas com cauda curta e plastrão reto (Molina & Rocha 1996). Em filhotes recém eclodidos a cauda tem o mesmo tamanho, sendo ainda curtas e o plastrão reto. Outra estrutura importante na diferenciação sexual é a papila urogenital, Magalhães (2017) descreve que ela é a precursora da cloaca na tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*), aparecendo aos 30-35 dias (Estágio 19); em *Emydura subglobosa*, esta estrutura torna-se perceptível aos 28 dias (Estágio 9) (Werneburg et al., 2009).

As taxas de crescimento de embriões de vertebrados é altamente variáveis dentro e entre as espécies e dependem da temperatura de incubação (Reiss 1989). A temperatura de incubação influencia sua duração e o grau de desenvolvimento (Janzen e Morjan 2002), em baixas temperaturas aumentam o tempo e diminuem a taxa de desenvolvimento, enquanto em temperatura elevada diminuem a duração e aumentam a taxa de desenvolvimento (Bull & Vogt, 1981; Alho et al. 1985; Souza & Vogt, 1994; Valenzuela, 2001). Desta forma, essas temperaturas precisam ser levadas em consideração quando das comparações, uma vez que os ovos incubados, em diferentes temperaturas podem apresentar resultados divergentes. Em *K. scorpioides* os ovos foram submetidos a incubação com temperatura média controlada de 28°C. As observações, mesmo semelhantes a outras espécies relatadas, tiveram algumas diferenças importantes e elas podem estarem ligadas aos caracteres morfológicos das variações interespecíficas, enquanto a temperatura de incubação influencia as diferenças relacionadas ao estágio embrionário.

As características morfológicas do desenvolvimento embrionário da espécie *K. scorpioides* apresentaram estados semelhantes, com poucas diferenças, a outras tartarugas. Algumas características foram encontradas atrasadas ou aceleradas em comparação aos achados de Ytema (1968), para a tartaruga *Chelydra serpentina*. Além disso, fortes evidências deste estudo, apoie a hipótese que as características morfológicas do desenvolvimento embrionário desta espécie, assemelham-se aos demais quelônios, apresentando algumas variações no surgimento e desaparecimento de estruturas.

As informações geradas pela análise do desenvolvimento embrionário de *K. scorpioides* fornecem base para pesquisas com espécies do mesmo gênero e também a outras espécies de cágados de água doce, uma vez que as condições de temperatura e umidade que os ovos são submetidos durante a incubação atuam na variação desse período, na velocidade das reações metabólicas e consequentemente no desenvolvimento do embrião. Outro aspecto na diferença entre a cronologia do desenvolvimento em tartarugas, pode ser atribuída as características morfológicas necessárias a cada espécie de acordo com seu habitat em decorrência do processo da própria evolução. Desta forma, o presente estudo contribui para o entendimento das várias fases da evolução embrionária e do manejo reprodutivo desta espécie controlada em cativeiro, levando em consideração a temperatura de incubação, valendo ressaltar a importância de ampliar os estudos para entender as variações intraespecíficas.

#### **4.CONCLUSÃO**

Em *Kinostemon scorpioides* as fases do desenvolvimento embrionário ocorreram em 105 dias, da postura a eclosão, em momentos de formações estruturais semelhantes a outras tartarugas, mesmo em períodos de tempos diferentes.

## REFERENCES

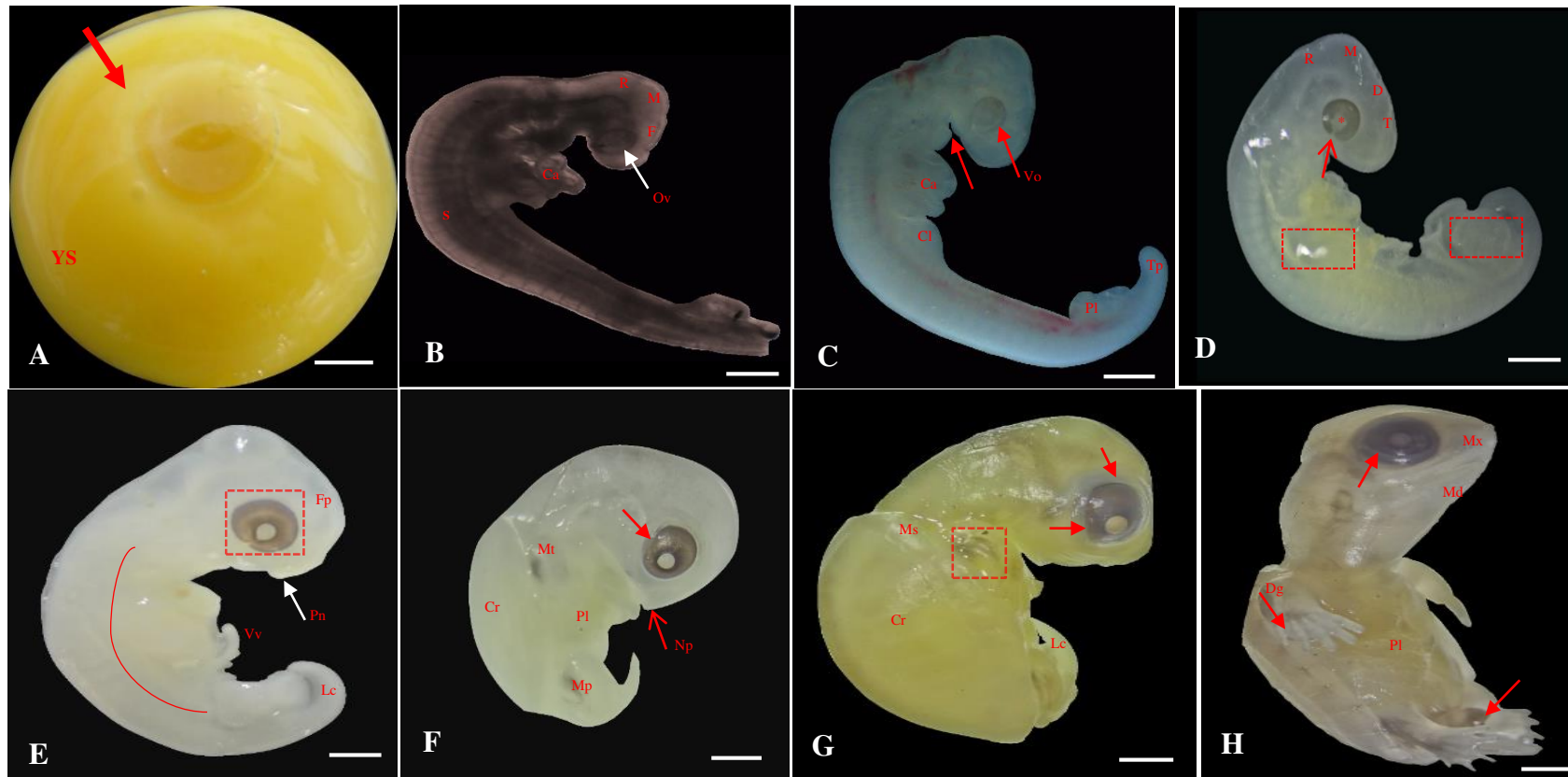
- Avma Panel on Euthanasia. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition. Schaumburg, Ill: AVMA, 2013. Available at: [www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf](http://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf). Accessed April 9, 2020.
- Alho, C. J. R., Danni, T. M. S., & Pádua, L. F. M. (1984). Influência da temperatura de incubação na determinação do sexo da tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa*, Testudinata: Pelomedusidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 44(3), 305-311.
- Andrews, R. M. (2004). Patterns of embryonic development. *See Deeming*, p. 75-102.
- Beggs, K., Young, J.; Georges, A.; & West, P. (2000). Ageing the eggs and embryos of the pig-nosed turtle, *Carettochelys insculpta* (Chelonia: Carettochelydidae), from northern Australia. *Canadian Journal Zoology* 78: 373-392. <https://doi.org/10.1139/z99-214>.
- Brasil (2015). Instrução Normativa Ibama nº 07, de 30 de abril de 2015. Institui e normatiza as categorias de uso e manejo da fauna silvestre em cativeiro, e define, no âmbito do IBAMA, os procedimentos autorizativos para as categorias estabelecidas. Brasília. Seção 1. p 125.
- Bull, J. J., Legler, J. M., & Vogt, R. C. (1985). Non-temperature dependent sex determination in two suborders of turtles. *Copeia*, 3, 784-786. <https://doi.org/10.2307/1444773>.
- Cagle, K. D., Packard, G. C., Miller, K., & Packard, M. J. (1993). Effects of the Microclimate in Natural Nests on Development of Embryonic Painted Turtles, *Chrysemys picta*. *Functional Ecology*, 7 (6), 653-660. <https://doi.org/10.2307/2390185>
- Carpenter, J. (2006). Formulário de animais exóticos. 3 ed. Buenos Aires: Inter-Medica. 560p.
- Castro, A. B. Biologia reprodutiva e crescimento do muçã *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1776) em cativeiro. (2006). Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Pará, Belém. 101.
- Crastz, F. (1982). Embryological stages of the marine turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz). *Revista de Biologia Tropical*, 30(2), 113-120.
- Fernandes Araujo Chaves, L. P., Viana, D. C., Chaves, E. P., Miglino, M. A., & de Sousa, A. L. (2020). Reproductive morphophysiology of the male scorpion mud turtle (*Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766) in captivity. *Veterinary Medicine and Science*, 1, 1-9. <https://doi.org/10.1002/vms3.245>.
- Crastz, F. (1982). Embryological stages of the marine turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz). *Revista de Biologia Tropical*, 30(2), 113-120.
- Ferreira Júnior, P. D. (2009). Aspectos ecológicos da determinação sexual em tartaru-gas. *Acta Amazonica*, 39:139-154. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672009000100014>.
- Gettinger, R. D., Paukstis, G. L., & Gutzke, W. H. N. (1984). Influence of hydric environment on oxygen consumption by embryonic turtles *Chelydra serpentina* and *Trionyx spiniferus*. *Physiological Zoology*, 57, 468-473.
- Greenbaum, E. A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta*. (2002). *Canadian Journal of Zoology*, 80, 1350-1370. <https://doi.org/10.1139/z02-111>.

- Greenbaum, E., & Carr, J. L. (2002). Staging criteria for embryos of the spiny softshell turtle, *Apalone spinifera* (Testudines: Trionychidae). *Journal of Morphology*, 254, 272-291. <https://doi.org/10.1002/jmor.10036>.
- Hall, B.K., & Miyake, T. How do embryos measure time? In Evolutionary change and heterochrony. (1995). Edited by K.J. McNamara. John Wiley and Sons, New York. 3-20,
- Leshem, A., & Dmi'el, R. (1986). Water loss from *Trionyx triunguis* eggs incubating in natural nests. *Herpetological Journal*, 1, 115-117.
- Magalhães, M. S. (2017). Desenvolvimento embrionário de *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae): descrição do pronefro e mesonefro e diferenciação gonadal em ambiente natural, Balbina, Amazonas. 2017. 134 f. Tese (Doutorado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.
- Miller, J. D. (1985). Criteria for staging reptilian embryos. In: Grigg, G., Shine, R. and Ehmann, H. (Eds.). *Biology of Australasian Frogs and Reptiles*. New South Wales, Australia: Royal Zoological Society of New South Wales, pp. 305-310.
- Miller, K., Packard, G. C., & Packard, M. J. (1987). Hydric conditions during incubation influence locomotor performance of hatchling of snapping turtles. *Journal of Experimental Biology*, 127, 401-412.
- Okada, Y., Yabe, T., & Sen-Ichi, O. (2011). Embryonic development of the Japanese pond turtle, *Mauremys japonica* (Testudines: Geoemydidae). *Curr Herpetologica*, 30, 89-102. <https://doi.org/10.5358/hsj.30.89>.
- Pereira, L. A., Sousa, A. L., Cutrim, M. V. J., & Moreira, E. G. (2007). Características ecológicas do habitat de *Kinosternon scorpioides scorpioides* Linnaeus, 1766 (Reptila, Chelonia, Kinosternidae) no município de São Bento- Baixada maranhense (Maranhão, Brasil). *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*, 20, 9-14.
- Pough, F. H., Janis, C. M., & Heiser, J.H. (2003). *A Vida dos Vertebrados*. (6ª ed.) São Paulo, Atheneu Editora.
- 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.
- Tokita, M., & Kuratani, S. (2001). Normal embryonic stages of the Chinese Softshelled turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae). *Zoological Science*. 18. 705-715. <https://doi.org/10.2108/zsj.18.705>.
- Valenzuela, N. (2001). Maternal effects on life-history traits in the Amazonian giant river turtle *Podocnemis expansa*. *Journal of Herpetology*, 368-378. <https://doi.org/10.2307/1565954>.
- Viana, D. C., Santos, A. C., Chaves, L. F. A., Oliveira, A. S., Assis Neto, A. C., & de Sousa, A. L. (2014). Body and testicular biometric parameters of the scorpion mud turtle (*Kinosternon scorpioides*). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 36(4), 477-481. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v36i4.22824>.
- Vieira, L. G., Santos, A. L. Q., Lima, F. C., Mendonça, S. H. S. T., Menezes, L. T. & Sebben, A. (2016). Osteologia de *Melanosuchus niger* (Crocodylia: Alligatoridae) e a evidência evolutiva. *Pesquisa. Veterinária Brasileira* 36(10), 1025-1044. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016001000018>.
- Vogt, R. C., Fagundes, C. K., Bataus, Y. S. L., Balestra, R. A. M., Batista, F. R. W., Uhlig, V. M., Silveira, A. L., Bager, A., Batistella, A. M., Souza, F. L., Drummond, G. M., Reis, I. J., Bernhard, R., Mendonça, S. H. S. T., & Luz, V. L. F. (2015).

Avaliação do Risco de Extinção de *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) no Brasil. *Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira*. ICMBio. Obtido em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/estado-de-conservacao/7407-repteis-kinosternon-scorpioides-mucua.html>.

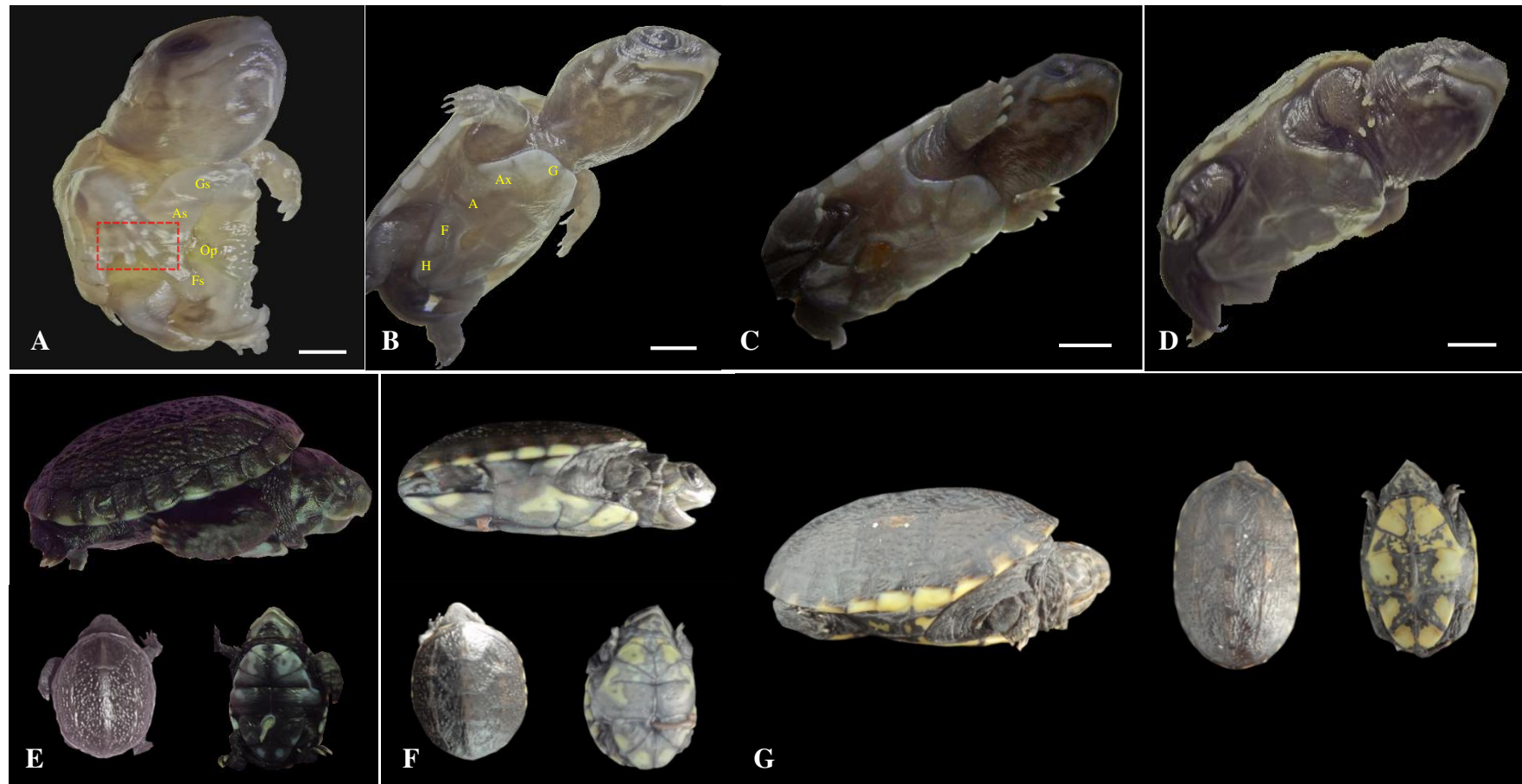
- Werneburg, I., Hugi, J., Muller, J., & Sánchez-Villagra, M. R. (2009). Embryogenesis and ossification of *Emydura subglobosa* (Testudines, Pleurodira, Chelidae) and patterns of turtle development. *Developmental Dynamics*, 238, 2770–2786. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22104>.
- Wyneken, J. (2001). *The Anatomy of Sea Turtles*. Miami: National Oceanic and Atmospheric Administration, U.S. Department of Commerce. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC, 470.
- Yntema, C. (1968). A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. *Journal of morphology*, 125(2), 219-251.

## **APÊNDICE**

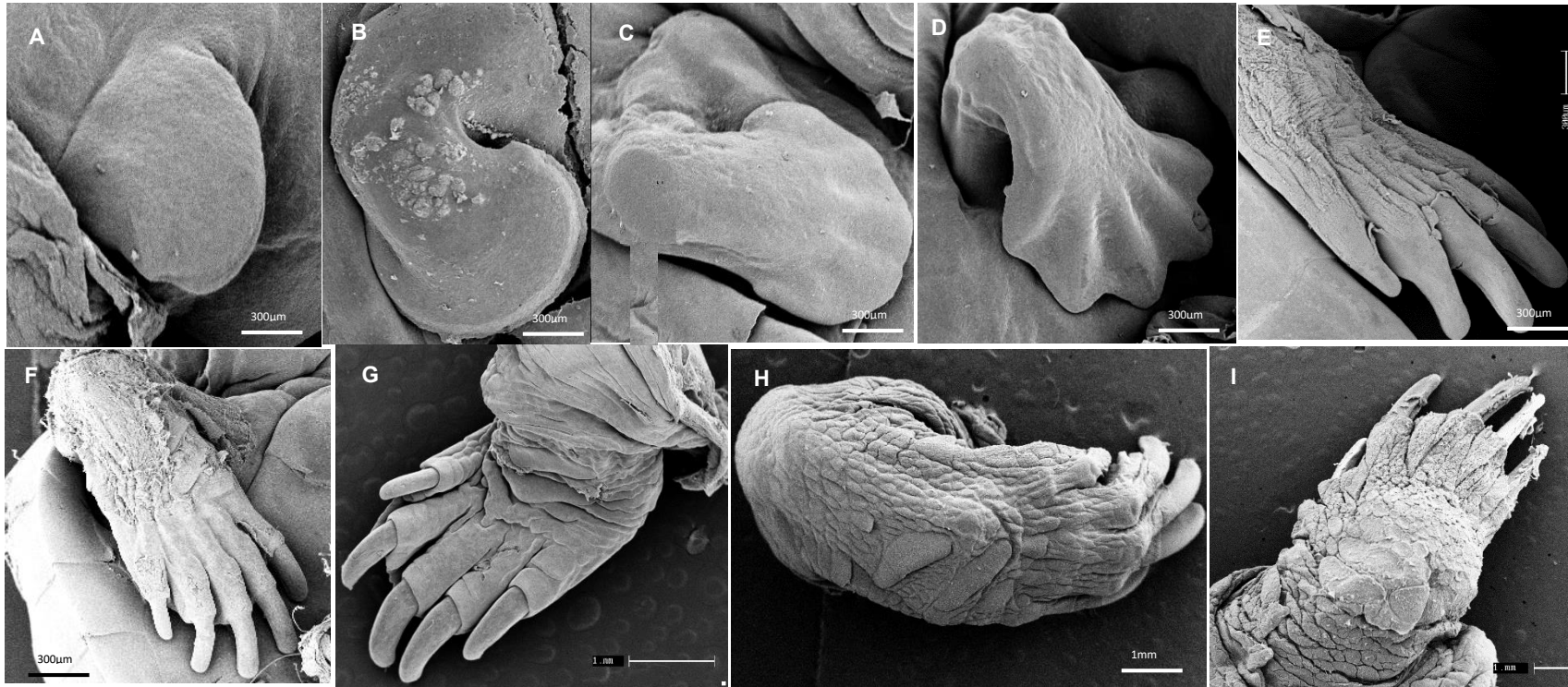


**Figure 1.** Embryonic development of *Kinosternon scorpioides*. Side view: **A** - Stage I: Yolk sac (YS), Blastodisc (arrow); **B**- Stage II: Cerebral vesicles - Forebrain (F), Midbrain (M), Rhombencephalon (R), Optic vesicle (Ov), Somites (S), Cardiac area (Ca). **C**- Stage III: Pharyngeal arch (arrow), Cardiac area (Ca), Chest limb bud (Cl), Pelvic limb bud (Pl), Tail process (Tp). **D**- Stage IV: Cerebral vesicles - Telencephalon (T), Diencephalon (D), Midbrain (M), Rhombencephalon (R), Pupil (asterisk), Choroidal fissure (arrow). **E** - Stage V: Placode (dashed rectangle), Fronto-nasal process (Fp), Longitudinal groove (red line), Vitelline vein (Vv). **F**- Stage VI: Nasal pit (Np), Carapace (Cr), Pastron in formation (Pl), upper eyelid (arrow); **G**- Stage VII: Marginal shields (Ms), Pigmentation of the base of the digits (dashed rectangle), upper and lower eyelid (arrow); **H**- stage VIII: Maxilla (Mx), Mandible (Md), Interdigital membrane (arrow), Urogenital papilla (Up).

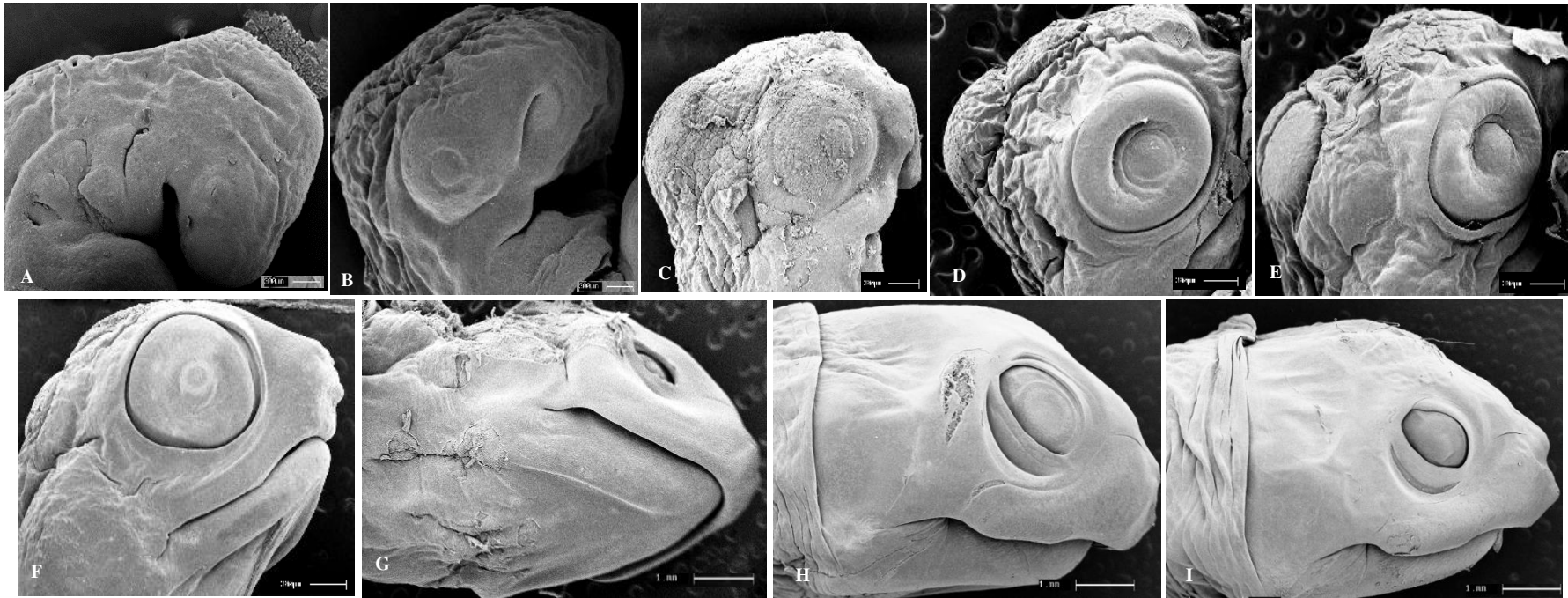
\* Image of *Kinosternon scorpioides* embryos in different stages of incubation. Barr scale: 0.1 cm



**Figure 2.** Embryonic development of *Kinosternon scorpioides*. Side view: **A** - Stage IX: Abdominal shield (As), Gular shield (Gs) and Femoral shield (Fs), Opening of the plastron (Op); **B**- Stage X: Dermal shields: Gular (G), Humeral (H), Abdominal (A), Femoral (F), Axillary (Ax), Inguinal shield (I). **C**- Stage XI: Head is light gray with small white spots and claws are thick and curved; **D**- Stage XII: Neck and limbs take on a dark gray color; scales on the limbs and longer claws. Dorsal and ventral view: **E**, **F** and **G** - Stage XIII to XV (day of birth): marked development of the phenotypic patterns of the species.



**Figure 3.** Electromicrograph of the thoracic limbs of *Kinosternon scorpioides* embryos. **A:** Stage III - Beginning of bud formation. **B:** Stage V - Bulging of the shoots in the lateral regions. **C:** Stage VI - Emergence of digital cards. **D:** Stage VII- Member with a serrated edge. **E:** Stage VIII - Five digits separated by digital membranes. **F:** Stage X- Digits with folded skin and claws; **G:** Stage XI - Higher number of skin folds, scales and thick and curved claws; **H:** Stage XII- Higher number of scales. **I:** Stage XIV- Member fully formed.



**Figure 4.** Electromicrograph of the head of *Kinosternon scorpioides* embryos. **A:** Stage II - Optic vesicle slightly recognized; pharyngeal arches. **B:** Stage III - more evident optic vesicle; maxillary and mandibular process. **C:** Stage V - Head region presents placode formed with retina and iris; maxillary process fused with the fronto-nasal process. **D:** Stage VI- Growth of the lower eyelids. **E:** Stage VII- Prominent placebo and formation of the upper eyelids; **F:** Stage VIII- Upper and lower eyelids beyond the edge of the eye; fully formed maxilla and mandible; presence of caruncle. **G:** Stage IX- Upper and lower eyelids; jaw, rhamphoteca and dewlap. **H:** Stage XI - Projections of the dermal papillae and a greater number of skin folds in the neck. **I:** Stage XII to Stage XIV - Most prominent and numerous neck folds; fully formed eyelids, clear pupils and presence of caruncle.

**Table 1.** List of freshwater chelonian with determined embryonic stages

| <b>Espécies</b>                  | <b>Nome Comum</b>                  | <b>Referência</b>                                 |
|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Chelydra</b>                  |                                    |                                                   |
| <i>Chelydra serpentina</i>       | Snapping turtle                    | Ytema (1968)                                      |
| <b>Chelidae</b>                  |                                    |                                                   |
| <i>Emydura subglobosa</i>        | Red-bellied Short-necked turtle    | Werneburg, Hugi, Muller e Sánchez-Villagra (2009) |
| <b>Emydidae</b>                  |                                    |                                                   |
|                                  | Painted turtle                     | Mahmoud, Hess e Klicka (1973)                     |
| <i>Chrysemys picta</i>           |                                    | Cordero e Janzen (2013)                           |
| <b>Emididae</b>                  |                                    |                                                   |
| <i>Trachemys scripta elegans</i> | Red-earedslider turtle             | Greebaum (2002)                                   |
| <b>Geoemydidae</b>               |                                    |                                                   |
| <i>Mauremys japonica</i>         | Japanese pond turtle               | Okada, Yabe e Odas (2011)                         |
| <b>Podocnemididae</b>            |                                    |                                                   |
| <i>Podocnemis unifilis</i>       | Yellow-spotted Amazon river turtle | Guzman e Bonilla (1990)                           |
| <i>Podocnemis expansa</i>        | Arrau turtle                       | Magalhães (2017)                                  |
| <b>Trionychidae</b>              |                                    |                                                   |
| <i>Apolone spinifera</i>         |                                    | Greebaum e Carr (2002)                            |
| <i>Pelodiscus sinensis</i>       | Spiny softshell turtle             | Tokida e Kuratani (2001)                          |

**CAPÍTULO III:** IMUNOLOCALIZAÇÃO E EXPRESSÃO GÊNICA DE P450 E SXO9:  
ASPECTO DO DESENVOLVIMENTO GONADAL DE *Kinosternon scorpioides*  
(TESTUDINES, KINOSTERNIDAE).

---

## IMUNOLOCALIZAÇÃO E EXPRESSÃO GÊNICA DE P450 E SOX9: ASPECTO DO DESENVOLVIMENTO GONADAL DE *Kinosternon scorpioides* (TESTUDINES, KINOSTERNIDAE).

Lianne Pollianne Fernandes Araujo Chaves<sup>1</sup>; Ligia Tchaicka<sup>2</sup>; Alana Lislea de Sousa<sup>3</sup>

1 Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, da Universidade Federal do Maranhão-UFMA. 2 Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, Universidade Estadual do Maranhão, UEMA. 3 Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão/UEMA, Campus Paulo VI, Tirirical, São Luís, Maranhão, Brasil

### RESUMO

A temperatura de incubação demonstrou controlar a determinação do sexo (TSD) das Subordens de tartarugas, incluindo tartarugas de água doce, terrestres e marinhas. O *Kinosternon scorpioides*, é um dos animais em que o seu sexo é determinado pela temperatura de incubação do ovo associado aos genes homólogos da determinação sexual genotípica (GSD) que desempenham um papel no processo de TSD. Os mecanismos que desencadeiam esse processo permanecem obscuros, e por isso a pesquisa objetivou-se caracterizar a biologia reprodutiva do *K. scorpioides*, tendo como base o desenvolvimento gonadal, por meio da análises imunohistoquímica e identificação de genes específicos (p450, Sox9), que podem estar relacionados ao desenvolvimento e manutenção de ovários e testículos. Os genes p450 (aromatase do citocromo) e Sox9 após a amplificação por PCR convencional foram expressos nas amostras de tecido de ovário e testículos de jurarás adultos e nas gônadas indiferenciada de embriões e filhotes. A imunorreação da enzima citocromo p450 aromatase e Sox9 foram positivos no complexo mesonefro-gônada em todas as fases embrionária estudadas. Em relação a expressão de genes específicos na determinação sexual, todos os genes estudados (p450 e Sox9), estão presentes nos órgão reprodutivo adultos e gônadas indiferenciada da espécie.

**Palavras-chave:** Quelônio; Expressão gênica; diferenciação sexual

IMMUNOLOCALIZATION AND GENE EXPRESSION OF P450 AND SOX9:  
ASPECT OF THE GONADAL DEVELOPMENT OF *Kinosternon scorpioides*  
(TESTUDINES, KINOSTERNIDAE).

Lianne Pollianne Fernandes Araujo Chaves<sup>1</sup>; Ligia Tchaicka<sup>2</sup>; Alana Lislea de Sousa<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, da Universidade Federal do Maranhão-UFMA. <sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, Universidade Estadual do Maranhão, UEMA. <sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão/UEMA, Campus Paulo VI, Tirirical, São Luís, Maranhão, Brasil

**ABSTRACT**

The incubation temperature has been shown to control the sex determination (TSD) of turtle Suborders, including freshwater, land and sea turtles. *Kinosternon scorpioides*, is one of the animals in which their sex is determined by the incubation temperature of the egg associated with the homologous genotypic sex determination (GSD) genes that play a role in the TSD process. The mechanisms that trigger this process remain unclear, and so the research aimed to characterize the reproductive biology of *K. scorpioides*, based on gonadal development, through immunohistochemistry and identification of specific genes (p450, Sox9), which may be related to the development and maintenance of ovaries and testicles. The genes P450 (cytochrome aromatase), and Sox9 after amplification by conventional PCR were expressed in the samples of ovarian tissue and testicles of adult swears and in the undifferentiated gonads of embryos and offspring. The immunoreaction of the enzyme cytochrome p450 aromatase and Sox 9 were positive in the mesonephrogonad complex in all studied embryonic phases. Regarding the expression of specific genes in sexual determination, all the studied genes (p450 and Sox9), are present in the adulterated reproductive organs and undifferentiated gonads of the species.

**Keywords:** Chelon; Gene expression; sexual differentiation

## 1. INTRODUÇÃO

A reprodução em cativeiro de quelônios torna-se importante por ser uma alternativa eficiente nos estudos e processos de conservação da biodiversidade da fauna silvestre. Desta forma a determinação dos períodos de diferenciação sexual e da maturação gonadal é imprescindível para o manejo ecológico e reprodutivo adequado de diversas espécie de quelônios. Nesse contexto insere-se, o *Kinosternon scorpioides*, quelônios de água doce, integrantes da fauna silvestre amazônica e maranhense com ampla distribuição geográfica e de importância social, cultural, econômica e ambiental, devido ao uso na culinária exótica regional.

Em *Kinosternon scorpioides*, assim como outras espécies de Testudines, a determinação sexual é inteiramente influenciada pela variação de temperatura (MALVASIO et al., 2002) e com isso, sabe-se que o controle genético na determinação sexual é desencadeado pela expressão de alguns genes, porém esse mecanismo molecular é ainda desconhecido. Nas espécies com esse tipo de determinação sexual, o sexo dos descendentes é determinado pela temperatura de incubação (TSD) durante um período sensível à temperatura (TSP) no terço médio do desenvolvimento (RAMSEY et al., 2007).

Os estudos sobre determinação sexual da temperatura (TSD) em quelônios envolvem dificuldades inerentes às características fisiológicas dos animais recém-eclodidos. O dimorfismo sexual, na maioria das espécies, somente é visível após alguns anos de vida, sendo que nos embriões e filhotes recém-eclodidos o meio mais seguro para se aferir o sexo são estudos histológicos (FERREIRA-JÚNIOR, 2009).

De forma geral, algumas espécies de quelônios podem apresentar a reprodução sincronizada pela variação de temperatura, bem como sua determinação sexual dependente da temperatura de incubação, como, por exemplo, *K. scorpioides*. O conhecimento dessas variações de temperaturas em diferentes regiões é fundamental, pois possibilita a elaboração de estratégias de manejo que são fundamentais para a conservação da espécie (FERREIRA JÚNIOR, 2009). Em contrapartida, o conhecimento genético aplicado aos estudos de desenvolvimento sexual em tartarugas têm mostrado resultados positivos, mesmo sendo atualmente pouco difundido e utilizados. Assim, há a necessidade da ampliação dos mesmos sobre a temática abordada e as informações a

níveis de genes envolvidos no processo reprodutivo também são mínimos (CHOJNOWSKI; BRAUN, 2012).

Muitas espécies de quelônios estão ameaçadas em consequência da perseguição desmedida do homem, que destrói os ovos, prática a caça predatória na época de reprodução, e destrói o habitat natural desses animais (FANTIN, 2008). O entendimento da influência da expressão gênica de proteínas específicas torna-se essencial para apurar os fatores que controlam a ecologia, a reprodução e a distribuição geográfica desse grupo pouco estudado de vertebrados. Podendo dessa forma, direcionar estratégias de reprodução em cativeiro, além de permitir um plano de manejo com uso sustentável com ênfase na conservação da espécie no ambiente natural, contribuindo com a conservação da biodiversidade. Sendo assim, a pesquisa tem o objetivo de caracterizar a biologia do desenvolvimento do *K. scorpioides*, tendo como imunolocalização e expressão de aromatase e Sox9, durante o desenvolvimento gonadal.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Local de Estudo e Licenças de Autorização**

A pesquisa foi realizada nas dependências do Criadouro Científico e Laboratório Experimental para a espécie *Kinosternon scorpioides*, no Laboratório de Patologia Molecular localizado no prédio do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão sob licença N° 1899339/ 2008/ IBAMA, do Curso de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Agrárias e no Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Universidade de São Paulo, Em atenção aos princípios de Bem Estar Animal, o projeto foi aprovado pelo SISBIO/ICMBio (licença nº: 47635-2/2015) e pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEAA) da UEMA (protocolo nº: 20/2016).

### **2.2 Obtenção das amostras**

Para coleta das gônadas dos adultos, os animais foram pré-anestesiados com cloridrato de xilazina 2% (40mg/kg/IM) e cloridrato de quetamina 10% (60mg/Kg/IM) e submetido à eutanásia pela administração de tiopental sódico a 2,5% (60mg/Kg/EV)

através da canulação do seio venoso cervical, de acordo com a técnica descrita por Schumacher (1996). Os embriões e filhotes recém eclodidos eram administrados, o mesmo anestésico na cavidade celomática (tiopental sódico a 2,5% :100mg/kg) (AVMA Panel on Euthanasia., 2013).

### **2. 3 Imunohistoquímica**

As amostras de complexo gônada-nefro de embriões em diferentes fases de desenvolvimento incubados a temperatura média de 28°C, foram fixadas em solução de formaldeído tamponado 10% por 24h, desidratadas em séries de etanol (de 70° a 100°) e diafanizadas com xilol para posterior inclusão em blocos de parafina. Em seguida, os blocos foram cortados a 5µm de espessura utilizando micrótomo Leica® modelo RM2125RT.

As amostras foram mantidas em geladeira overnight (pelo menos 12 horas a 4°C) e, posteriormente em estufa a 60°C por 30 minutos. Então, foram desparafinizadas em duas soluções de xilol (25 minutos cada), em solução de xilol com álcool (15 minutos) e reidratadas em soluções alcoólicas (100° e 70°, 10 minutos cada) seguidas de água destilada (5 minutos).

Os epítomos dos antígenos foram expostos através de imersão em tampão citrato em temperatura ambiente e então sob fervura em panela de pressão por 5 minutos cada etapa. Então, as amostras ficaram em repouso por 30 minutos em capela com exaustor. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio a 5% em metanol. Foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos cada com soluções phosphate buffered saline (tampão fosfato salino - PBS) de pH 7,4. depois um bloqueio de proteínas com normal horse serum (R.T.U Normal Horse Serum 2,5% - Vector Laboratories®) e então as amostras foram incubadas com anticorpos primários foram P450aromatase, SOX9, durante 16 horas. Nos controles negativos foi adicionado apenas solução PBS.

Após a incubação com anticorpo primário, conjugado com anticorpo secundário(ImmPRESS® Universal Polymer Kit, Peroxidase – Horse Anti- 23 Mouse/Rabbit IgG – Vector Laboratories). Para a revelação, utilizou-se substrato-cromogénico 3,3'-diaminobenzidina (DAB+ Dako®). As amostras foram contra coradas com hematoxilina e em seguida montadas com lamínula.

## **2. 4 Análises moleculares**

Para análise molecular as amostras foram divididas em 4 grupos sendo cada grupo com 5 animais, totalizando 20 animais (Grupo 1: machos adultos; Grupo 2: fêmea adulta; Grupo 3: embriões acima de 12 semanas e Grupo 4 : filhotes recém-nascido). Os embriões e filhotes são oriundo de incubação com temperatura média de 28°C

### **2.4.1 Extração de RNA, PCR convencional e otimização dos iniciadores da PCR**

O RNA total foi extraído de fragmentos de gônadas a partir do reagente Trizol® Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia) de acordo com as especificações do fabricante. Foram adicionado 200 uL de clorofórmio e agitadas por 15 segundos e deixadas em temperatura ambiente por 3 minutos. Centrifugou-se a 12.000 xg durante 15 minutos a 4° C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 500 uL de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas três vezes e incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Logo após, foram centrifugadas a 12.000 xg por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante vou descartado e 1 ml de etanol a 75% foi adicionado e vórtexizado por 15 segundos. Procedeu-se a centrifugação a 7.500 xg por 5 minutos a 4° C e o sobrenadante desprezado. O pélet foi ressuspendido em 30 uL de água DEPC e as amostras foram incubadas em termobloco a 55° por 15 minutos.

O RNA total (3uL) foi retrotranscrito em cDNA utilizando o kit comercial Super Script III First-Strand Synthesis supermix para RT-PCR (Invitrogen), para uma reação de volume final de 20 uL. Para a síntese foram utilizados 3,0uL de água DEPC, 1,0uL de Randon Hexâmero (50ug/uL), 1,0uL de Anneling Buffer, 2,0uL de RNase out Enzyme Mix, 1,0uL de 2x First-Strand Reaction Mix. Os parâmetros utilizados para a síntese de cDNA foram: 65°C por 5 minutos, incubado em gelo por 1 minuto, 25° por 10 minutos e 50°C por 50 minutos. Posteriormente o cDNA foi armazenado a -20°C até a realização da PCR.

Para a amplificação dos genes de interesse (PP1, P450 e SOX9), foram utilizados primers heterólogos indicados na tabela 1, os seguintes reagentes para cada amostra de DNA complementar (cDNA): 5 uL de GoTaq®Colorless Master Mix; 1,5 uL de primer

forward; 1,5 uL de primer reverse; 1,5 uL Mg+ e 1,5 uL de cDNA. O volume final foi de 9,5 uL. As amostras foram todas processadas no Termociclador (PCR Genemate series) e os ciclos consistiram de 50°C por 5 minutos, seguidos 40 ciclos de amplificação a 95°C por 2 minutos; temperatura de anelamento (Tm) 60°C por 15 segundos e 72°C por 15 segundos seguidos de 72°C por 3 minutos. Sendo a temperatura de anelamento dos primers foi padronizada de acordo com as descritas em Rodrigues, (2015), sendo de 60°C.

Os produtos de PCR foram visualizados, inicialmente, mediante a aplicação de 4µl do amplificado em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, submetido à eletroforese horizontal por 40 minutos a 90 V, em tampão TBE 1X. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta e imagens digitais foram gravadas com um modelo L-PIX Image EX (Loccus Biotecnologia, Brasil). Verificada a amplificação almejada, os produtos de PCR foram submetidos purificação utilizando o kit Wizard® SV Gel (PROMEGA, E.U.A.), e em seguida, foram encaminhados para sequenciamento em empresa especializada.

**Tabela 1.** Lista de genes e iniciadores utilizados no PCR convencional.

| Gene        | Iniciadores (5'-3')                                    | Tamanho<br>do<br>fragmento | Referência               |
|-------------|--------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| <b>PP1</b>  | CAGCAGACCCTGAGAACTTCTTCCTG<br>GCGCCTCTTGCACTCATCAT     | 95                         | Ramsey et al.,<br>2007   |
| <b>P450</b> | GCACATGGACTTTGCATCACA<br>GAACCATCATCTCCAACACACACTGGTTC | 95                         | Ramsey et al.,<br>2007   |
| <b>SX09</b> | CCTGCCCTTCTGGTTCCG<br>TCCTCGTCGCTCTCTTTCTTCAG          | 105                        | Barske &<br>Capel (2010) |

#### 2.4.2 Sequenciamento e Análises de Dados

O sequenciamento foi realizado pelo método didesoxi terminal. Cromatogramas foram inspecionados e editados com o auxílio do programa Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium Inc.), posteriormente alinhados, e novamente inspecionados, com o

auxílio do programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Para verificar existentes dos genes estudados, foram comparadas as sequências existentes de quelônios no NCBI Genbank.

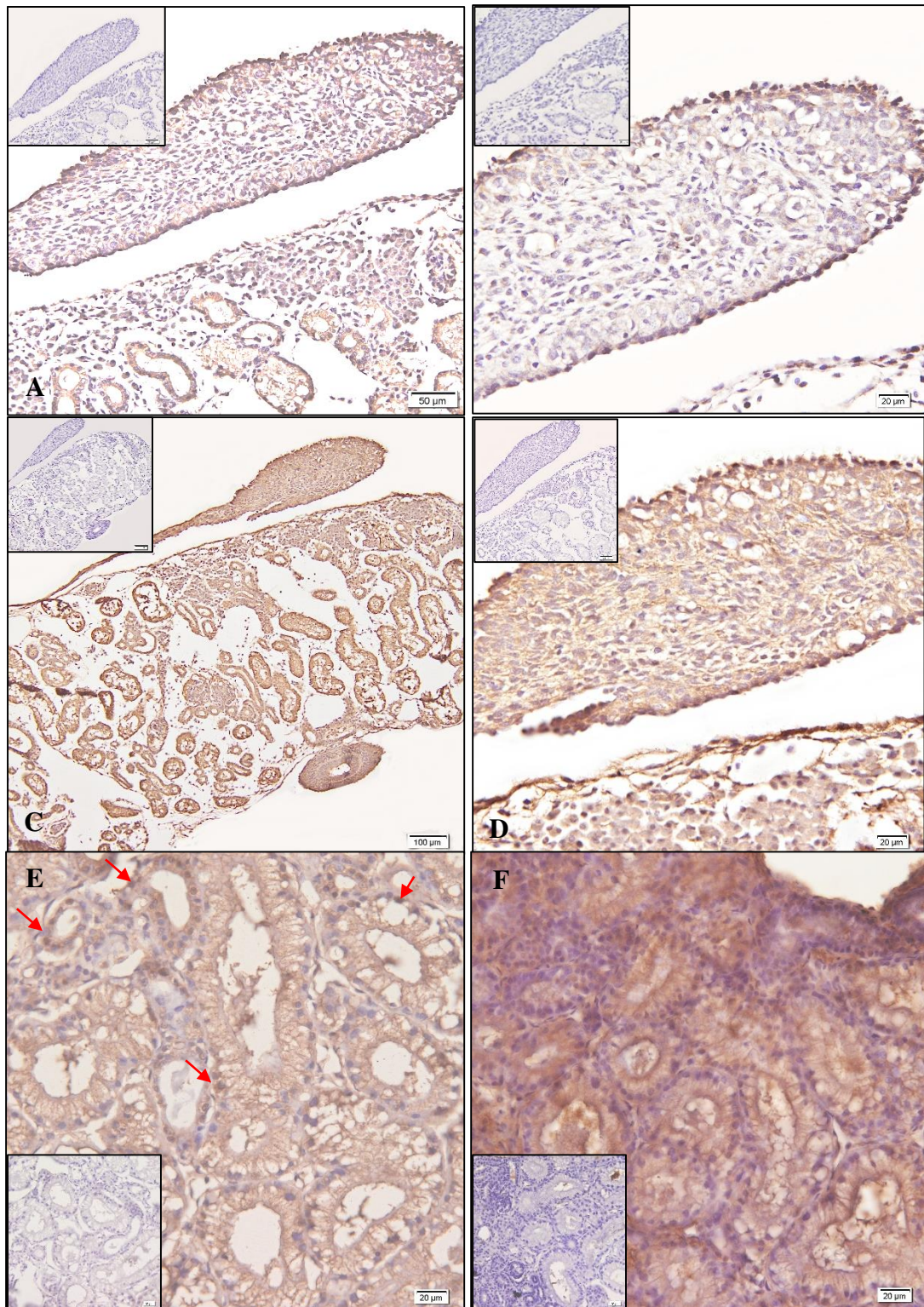
### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Imunohistoquímica**

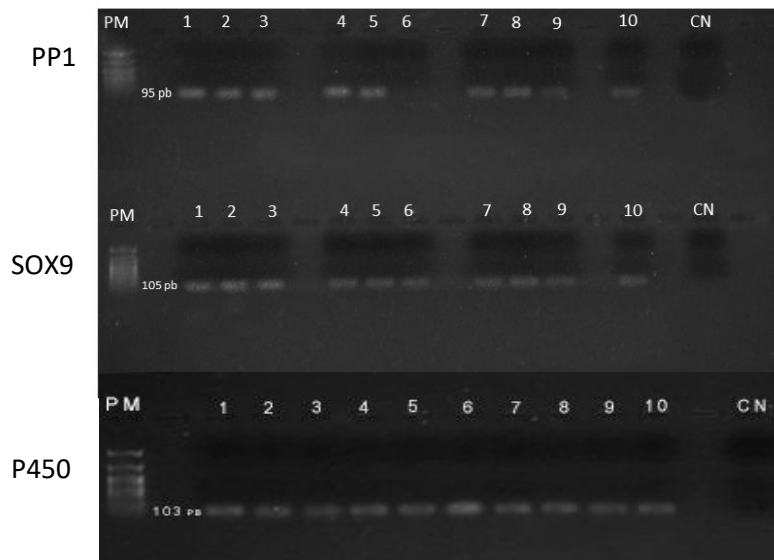
A imunorreação da enzima citocromo p450 aromatase e da proteína SOX9 demonstrou-se positiva no complexo mesonefro-gônada de todas fases embrionária estudadas, não havendo distinção de imunorreação entre os túbulos renais. A enzima citocromo p450 aromatase foi fortemente coradas no epitélio de revestimento e tecido intersticial. Enquanto que a imunomarcação da Sox 9 apresentou-se fortemente corado apenas no epitélio de revestimento e moderadamente na região intersticial do complexo mesonefro-gônada em todas a fases analisada. Verificou-se marcação positiva da Sox9 a nível citoplasmático e nuclear no complexo mesonefro-gônada de embrião com 84 dias de incubação. Os tecidos utilizados para controle negativo não apresentaram imunoreatividade para nenhum dos casos (Fig 01).

#### **3.2 Análise molecular**

Os genes investigados apresentaram expressão tanto em ovário, testículo, gônadas de filhotes e complexo mesonefro-gônada de embrião (Fig 02) e após o alinhamento, edição e comparação das sequências dos genes pode-se observar uma identidade acima de 90% com os genes existentes de outros quelônios, conforme descrito na tabela 2.



**Figura 1.** Imunolocalização da proteína Sox9 e enzima p450 aromatase em complexo gônada- nefron de embriões de *Kinosternon scorpioides*. **A, B e E** : A expressão Sox9 e seu controle negativo. **E**: imunorreação nuclear da Sox9 (setavermelha). **C, D e F**: A expressão de aromatase e seu controle negativo.



**Figura 02:** Imagem do gel dos produtos de PCR para a Protein Phosphatase 1 (PP1), Aromatase (P450) e Sxo9 em testículo, ovários e complexo nefro-gônadas de filhote e embrião de *K. scorioides*. Os números correspondem às amostras analisadas no estudo.

**Tabela 2:** Análise comparativa de identidade dos genes (PP1, P450 e Sxo9) de *Kinosternon scorioides* com outras espécies de quelônios.

| Espécies                            | Pp1 | P450 | Sxo9 |
|-------------------------------------|-----|------|------|
| <i>Chelonia mydas</i>               |     |      | 97%  |
| <i>Chrysemys picta</i>              |     | 100% |      |
| <i>Chrysemys picta bellii</i>       | 92% | 100% | 97%  |
| <i>Lepidochelys olivacea</i>        |     |      | 97%  |
| <i>Mauremys reevesii</i>            |     | 100% |      |
| <i>Pelodiscus sinensis</i>          | 96% | 100% |      |
| <i>Terrapene mexicana triunguis</i> |     | 100% | 97%  |
| <i>Trachemys scripta</i>            | 92% | 100% | 97%  |

#### 4. DISCUSSÃO

As características das gônadas em testudines são similares para ambos os sexos até a diferenciação sexual do embrião (MILLER; LIMPUS, 2003), que ocorrerá sob influência hormonal (como a síntese das enzimas Aromatase e SOX9) e da temperatura

durante o período termossensível (TSP) (CREWS et al., 1994; PIEAU, 1996; PIEAU; DORIZZI 2004). Usualmente, quando embriões de Testudines são submetidos à temperaturas de incubação mais baixas, ocorre maior desenvolvimento de machos, enquanto que em temperaturas mais elevadas, há maior proporção de embriões fêmeas, sendo este padrão definido como TSD (EWERT et al., 1991). No presente estudo, as condições médias da temperatura de incubação a 28°C, promoveram a ocorrência do desenvolvimento de ambos os sexos, apresentando conformações morfológicas semelhantes às descritas na maioria das espécies de tartarugas encontradas na literatura (MALVASIO, 2002b; DELGADO, 2010; WYNEKEN, 2001; MILLER & LIMPUS, 2003).

As sugestões de temperatura e a presença dos hormônios esteroides durante o período termosensível, incidem diretamente sobre a gônada indiferenciada contribuindo para o desenvolvimento de um testículo ou ovário (MOROHASHI et al., 2013). Portanto, alterações no ambiente hormonal ou um deslocamento na temperatura podem alterar determinação sexual do embrião de tartaruga (MERCHANT et al., 1997). Durante a fase embrionária, a presença dos hormônios se constitui de suma importância para a diferenciação e estabelecimento sexual, pois genes específicos envolvidos na biossíntese de esteroides são diferentemente expressos nas células somáticas de testículos e ovários (NAKAMURA et al., 2010). A expressão de P450 e Sox 9 expressou-se de forma semelhante em ovário, testículo de *Kinosternon scorpioides*.

Em *Kinosternon scorpioides*, assim como outras espécies de Testudines, a determinação sexual é inteiramente influenciada pela variação de temperatura (MALVASIO et al., 2002) e com isso, sabe-se que o controle genético na determinação sexual é desencadeado pela expressão de alguns genes, porém esse mecanismo molecular é ainda desconhecido. No presente estudo, o gene PP1, foi utilizado como gene de referência, utilizando com base o trabalho de Rodrigues, 2020 que descreveu o gene PP1 como gene de referência para a espécie. Os genes de controle interno (genes de referência) são comumente utilizados para normalizar RT-qPCR e para reduzir possíveis erros gerados na quantificação da expressão do gene, a qual é obtida através da comparação dos níveis de expressão em amostras analisadas do gene de interesse e de genes constitutivos de controle estável (PAOLACCI et al., 2009).

A expressão da enzima aromatase P450 indica pontos de síntese de estrógeno (RAMSEY; CREWS, 2007), porém, a análise simultânea de todo o complexo gônada-néfron parece dificultar a diferenciação sexual de embriões durante o período termossensível, devido a uma redução na sensibilidade das gônadas frente à presença dos outros tecidos (PIEAU; DORIZZI, 2004). A dificuldade de diferenciação sexual também ocorreu no nosso estudo pois a imunolocalização da p450 apresentou-se de forma semelhante em todo complexo gonada nefron e embrião e filhotes.

No estudo da ontogênese de *P. expansa* testou-se a imunolocalização da enzima aromatase, sendo que, nas gônadas indiferenciada a imunomarcagem apenas no epitélio de revestimento. Em um embrião de 45 dias de incubação que diferenciou a gônada em ovário, o epitélio de revestimento e tecido intersticial foram fortemente corados. No testículo de embrião de 47 dias de incubação verificou-se marcação positiva restrita as células intersticiais entre os túbulos seminíferos (MAGALHÃES, 2017). Nos testículos de *Kinosternon scorpioides* adultos a imunomarcagem para p450 aromatase está presente nas células de Leydig, células de Sertoli e proximidades das células germinais (VIANA, 2016).

A Aromatase do citocromo P450, é a enzima que catalisa irreversivelmente os andrógenos em estrogênios, e, portanto, desempenha um papel central no equilíbrio da produção de hormônios esteroides. Expressão elevada do gene da aromatase é consistentemente observado na diferenciação dos ovários enquanto que sua expressão é suprimida durante o desenvolvimento dos testículo (SAKATA et al., 2005). A atividade da aromatase aumenta em certas temperaturas, que variam para cada espécie. Em tartarugas marinhas e de água doce, temperaturas mais altas causam um aumento exponencial da atividade da aromatase, enquanto que em temperaturas baixas, a atividade da aromatase permanece baixa (PIEAU; DORIZZI 2004). Em *Trachemys scripta* quando o níveis máximos de expressão entre duas temperaturas foram comparados, observou-se que os níveis de aromatase é altamente expressa nas gônadas de embriões em temperaturas produtoras de fêmeas (RAMSEY et al., 2007).

O gene *SXO9*, em mamíferos é crítico para o desenvolvimento normal de testículos e possui também uma importância óbvia a outros processos de desenvolvimento. Além disso, a proteína citoplasmática *SOX9* está presente em gônadas

indiferenciadas de ambos os sexos e na gônada masculina ela se torna nuclear no início da diferenciação testicular (GASCA et. al., 2000). No complexo mesonefro-gônada de *Kinosternon scorpioides* verificou-se marcação positiva das células do parênquima renal a nível citoplasmática e nuclear. Os animais utilizados nesse estudos são provenientes de ovos incubados em temperaturas média de 28°C que são temperaturas produtoras de fêmeas, desta forma os resultados indicam que não existe uma correlação da expressão de Sox 9 com a determinação do sexo feminino.

Ao analisar a expressão durante o período de determinação e diferenciação gonadal. Spotila et al., (1998) e Western et al., (1999) relataram em *Trachemys scripta*, e no *Alligator mississippiensis* respectivamente, que o SOX9 foi criado para regular positivamente as gônadas de embriões incubados em temperaturas produtoras de machos (MPT). Usando Northern blot, Spotila et al. (1998) relataram que a expressão SOX9 é maior nas gônadas de embriões incubados em temperaturas produtoras de machos (MPT) do que embriões incubados em temperaturas produtoras fêmeas (FPT) em *T. scripta*, enquanto Western et al. (1999) por RT-PCR e hibridização in situ relataram que SOX9 é expresso apenas em gônadas de embriões incubado em MPT.

No presente estudo, os animais foram incubados em temperaturas produtoras fêmeas (FPT) e a expressão do genes foi avaliada apenas por PCR convencional, não permitindo desta forma, a quantificação dos genes expressos na amostra para avaliar a influenciaram ou não da temperatura de incubação dos ovos durante o período embrionário.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A imunorreação da enzima citocromo p450 aromatase ocorreu no mesonefro-gônada de embrião de *Kinosternon scorpioides*.
- A imunorreação da proteína Sox 9 ocorreu mesonefro-gônada de embrião de *Kinosternon scorpioides*.
- Foi identificado a expressão dos PP1, P450 e SOX9 nos ovários, testículos e em gônadas de filhotes e complexo gônada-nefron de embriões.
- Experimentos por meio da PCR em tempo real são necessários para permitir a quantificação dos genes expressos na amostra para avaliar a influenciaram ou não da temperatura de incubação dos ovos durante o período embrionário na

expressão desses genes, na determinação sexual desta espécie e posteriormente na maturação e manutenção da gônada.

## 6. REFERÊNCIAS

- CHOJNOWSKI, J. L. & BRAUN, E. L. Na unbiased approach to identify genes involved in development in a turtle with temperature-dependent sex Determination. *BMC Genomics*, 13:308, 2012.
- CREWS, D.; BERGERON, J. M.; BULL, J. J.; FLORES, D.; TOUSIGNANT, A.; SKIPPER, J. K.; WIBBELS, T. Temperature-dependent sex determination in reptiles: Proximate mechanisms, ultimate outcomes, and practical applications. **Developmental Genetics**. v. 15, n. 3, p. 297–312, 1994.
- DELGADO, C. M. N. **Gonad development and hormone titres in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the NE Atlantic**. 2008. 164 f. Tese (Doutorado) - Universidade da Madeira, Portugal, 2008.
- EWERT, M. A. Cold torpor, diapause, delayed hatching and aestivation in reptiles and birds. In: DEEMING, D. C.; FERGUSON, M. W. J. (Org.) **Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles**. Cambridge, England: Cambridge University Press. 448p. p. 173-212. 1991.
- FANTIN, C. Desenvolvimento de marcadores moleculares de microssatélites para o estudo do sistema reprodutor em três espécies de tartarugas do gênero *Podocnemis*. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas. p. 2, .2008.
- FERREIRA-JÚNIOR, P. D. Aspectos ecológicos da determinação sexual em tartarugas. *Acta Amazonica*, 39(1):139-154, 2009.
- GASCA S, CANIZARES J, DE SANTA BARBARA P, MEJEAN C, POULAT F, BERTA P & BOIZET-BONHOURE B.. A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** , 99, 11199-204. 2002 12169669 DOI.
- MAGALHÃES, Marcela. Desenvolvimento embrionário de *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae): descrição do pronefro e mesonefro e diferenciação gonadal em ambiente natural. 2017. 150 f. **Tese** (Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2017.
- MALVASIO, A., SOUZA, A.M., FERREIRA JÚNIOR, P. D., REIS, E. S., SAMPAIO, F. A. A. Temperatura de incubação dos ovos e granulometria dos sedimentos das covas relacionadas à determinação sexual em *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) e *P. unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Pelomedusidae). *Publicações Avulsas do Instituto Pau Brasil de História Natural*. São Paulo, 5(1): 11-25, 2002.
- MALVASIO, A. *et al.* Temperatura de incubação dos ovos e granulometria dos sedimentos das covas relacionadas a determinação sexual em *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) e *P. unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Pelomedusidae). **Publicações Avulsas do Instituto Pau Brasil de História Natural**, Arujá, n. 5, p. 11-25, 2002b.

- MERCHANT-LARIOS, H.; RUÍZ-RAMÍREZ, S.; MORENO- MENDOZA, N.; MARMOLEJO, V. A. Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. **General and Comparative Endocrinology**. v. 107, n. 3, p. 373-385, 1997.
- MILLER, J. D.; LIMPUS, C. J. Ontogeny of Marine Turtle Gonads. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A.; WYNEKEN, J. (Org.) **The Biology of Sea Turtles**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2003. p. 199-224.
- MOROHASHI, K.; BABA, T.; TANAKA, M. Steroid hormones and the development of reproductive organs. **Sexual Development**. v. 7, n. 1-3, p. 61-79, 2013.
- WYNEKEN, J. Urogenital System. In:\_\_\_\_. **The Anatomy of Sea Turtles**. U.S Department of Commerce, 2001. p. 153-168.
- PAOLACCI, A.R. et. al. Identification and validation of reference genes for quantitative RTPCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology*, v.10, p.11, 2009.
- PIEAU, C. 1996. Temperature variation and sex determination in reptiles. *BioEssays*, 18(1): 19-26.
- PIEAU C, DORIZZI M: Oestrogens and temperature-dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads. **J Endocrin**, 2004, 181:367-377.
- RAMSEY, M.; SHOEMAKER, C.; CREWS, D. Gonadal expression of Sf1 and aromatase during sex determination in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*), a reptile with temperature-dependent sex determination. *Differentiation*, 75(10):978-991, 2007.
- RAMSEY, M. & CREWS, D. Adrenal-kidney-gonad complex measurements may not predict gonad-specific changes in gene expression patterns during temperature-dependent sex determination in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta elegans*). *Journal Experimental of Zoology*, 307A(8):463-470. 2007.
- RODRIGUES, C. A. L.; TCHAICKA, L; CARVALHO-NETA, A. V. DE; SANTOS L. S. DOS; SOUSA A. L. Protein Phosphatase type 1 identification in different embryonic development stages from *Kinosternon scorpioides*. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n. 6, p.41089-41099, jun. 2020.
- SAKATA N, TAMORI Y, WAKAHARA M. P450 aromatase expression in the temperature-sensitive sexual differentiation of salamander (*Hynobius retardatus*) gonads. **Int J Dev Biol** 49: 417–425. 2005.
- SPOTILA, L. D.; SPOTILA J. R.; HALL S. E. Sequence and Expression Analysis of Wt1 and Sox9 in the Red-Eared Slider Turtle, *Trachemys scripta*. *Journal of Experimental Zoology*, 281:417–427. 1998
- VIANA, DIEGO. Sazonalidade reprodutiva em machos de tartaruga (*Kinosternon scorpioides*) de vida livre no Nordeste brasileiro evidenciado por imunolocalização de

enzimas esteroidogênicas no testículo e epidídimo. São Paulo, 2016. 60f. **Tese** (Doutorado em Ciências – Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

WESTERN P, HARRY JL, GRAVES JAM, SINCLAIR AW. 1999. Temperature-dependent sex determination: upregulation of *SOX9* expression after commitment to male development. *Dev Dyn* 214:171–177.

WYNEKEN, J. Urogenital System. In:\_\_\_\_. **The Anatomy of Sea Turtles**. U.S Department of Commerce, 2001. p. 153-168.