



**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

CARLOS ALAILSON LICAR RODRIGUES

**Biologia do desenvolvimento da tartaruga semi-aquática *Kinosternon scorpioides*
(Testudines, Kinosternidae): validação do gene de referência Protein Phosphatase 1 (PP1)**

SÃO LUÍS - MA

Março, 2015

CARLOS ALAILSON LICAR RODRIGUES

**Biologia do desenvolvimento da tartaruga semi-aquática *Kinosternon scorpioides*
(Testudines, Kinosternidae): validação do gene de referência Protein Phosphatase 1 (PP1)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador (a): Profa Dra Alana Lislea de Sousa

Co-orientador (a): Profa Dra. Lígia Tchaicka

SÃO LUÍS - MA

Março, 2015

Rodrigues, Carlos Alailson Licar.

Biologia do desenvolvimento da tartaruga semi-aquática *Kinosternon scorpioides* (Testudines, Kinosternidae): validação do gene de referência Protein Phosphatase 1 (PP1)/Carlos Alailson Licar Rodrigues.–São Luís, 2015.

69 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa

1.TSD. 2.*Kinosternon scorpioides*. 3. Biologia do desenvolvimento. 4.Genética.
I.Título

CDU: 598.13:575.16

CARLOS ALAILSON LICAR RODRIGUES

Biologia do desenvolvimento da tartaruga semi-aquática *Kinosternon scorpioides* (Testudines, Kinosternidae): validação do gene de referência Protein Phosphatase 1 (PP1)

Data: ___/___/___

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa
Centro de Ciências Agrárias
Universidade Estadual do Maranhão
(orientadora)

1ª Examinadora
Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu-Silva
Centro de Ciências Agrárias
Universidade Estadual do Maranhão

2ª Examinadora
Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho-Neta
Centro de Educação, Ciências Exatas e Naturais
Universidade Estadual do Maranhão

3ª Examinadora
Profa. Dra. Lígia Tchaicka
Centro de Educação, Ciências Exatas e Naturais
Universidade Estadual do Maranhão

Dedico este trabalho aos meus pais Gracilene Licar Rodrigues e Antônio Mendes Rodrigues (*in memoriam*), aos meus irmãos, parentes e amigos pelo apoio, reconhecimento, carinho e confiança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, fonte de luz, sabedoria, força, perseverança e por me fazer vencer as jornadas de tropeços, derrotas e vitórias. Obrigado por fazer parte da minha vida.

À minha mãe Gracilene Licar, ao meu pai Antônio Mendes Rodrigues (*in memoriam*), aos meus irmãos Daiana Licar e Dennys Licar. Muito obrigado por sempre confiarem em mim e acreditarem no meu potencial. Sou grato por vocês serem parte de mim. Amo todos vocês.

Aos meus parentes, avós, tios, primos, sobrinhos, e em especial à minha grande vovó Maria do Carmo Licar e ao meu vovô Luziano Licar por sempre me ouvir e me receber de braços abertos com amor e carinho. À minha grande educadora tia Valdilene Licar Supriano por sempre confiar em mim e dar-me coragem para continuar o caminho.

Às minhas orientadoras Profa. Dra. Alana Lisléa de Sousa e Profa. Dra. Ligia Tchaicka por me mostrar o caminho certo e o verdadeiro significado da ciência e da pesquisa. Sou muito grato a todas vocês por contribuir na minha formação profissional e pessoal. Muito obrigado!

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e estiveram juntos compartilhando tristezas, vitórias, conquistas e alegrias. Aos amigos, sintam-se todos agradecidos, em especial Andreia de Lourdes, Welton Vale e Luiz Otávio que sempre estiveram comigo nas horas que precisei.

Aos meus amigos de laboratório Ana Paula Sampaio Amorim (você é especial), Lília Carla, Fernanda Paz, Camila Penha, Joseane Lima, Larissa Sarmento, Almerinda e Karol que sempre me fizeram companhia e me ajudaram no que foi preciso. Nunca irei esquecer-me das nossas gargalhadas no laboratório em dias de muita pesquisa e dedicação. Muito obrigado pela companhia!

A toda equipe dos grupos de estudos em Anatomia (GRANATO) e Genética da Conservação (GGC). Grupos pelo qual aprendi e absorvi muito conhecimento nas discussões e leituras científicas. Obrigado a todos (as)!

À secretária do PPGCA Francisca Canavieira, obrigado por ser uma pessoa humilde, atenciosa, prestativa e por sempre me ajudar nas horas precisas. Você foi e será uma grande amiga!

Às tartarugas (eternos jurarás) da baixada maranhense, participantes e “voluntários” em minha pesquisa. Nunca irei esquecer a primeira mordida no laboratório a mim consagrada.

À Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) por contribuir e proporcionar formação profissional. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela estrutura, pela formação enquanto Mestre em Ciência Animal. Muito Obrigado!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceder auxílio financeiro em forma de bolsa durante todo o mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) por prestar apoio financeiro à pesquisa por meio Edital Rebax 030/2013.

Quero agradecer a todos (as) que contribuíram direta ou indiretamente para o meu crescimento acadêmico e profissional. Sintam-se todos agradecidos!

"A pressa nunca lhe trará sucesso, pois se lembre de que as tartarugas sempre conhecerão o caminho melhor que os coelhos".

Fernando Campos

RESUMO

Biologia do desenvolvimento da tartaruga semi-aquática *Kinosternon scorpioides* (Testudines, Kinosternidae): validação do gene de referência Protein Phosphatase 1 (PP1)

Dados documentais científicos disponibilizados nas bases de dados tanto brasileira quanto mundial sobre as tartarugas representam valiosas contribuições a novos estudos sobre os répteis. Entretanto, as pesquisas sobre quelônios ainda necessitam de novas informações de sustentação científica em aspectos referentes à própria biologia que levem a tomadas de ações voltadas para a conservação das espécies. Diante disso, o capítulo I tem como objetivo fazer o delineamento do estado da arte para a espécie *K. scorpioides*, de forma a contribuir com informações científicas não somente para esta espécie, mas aos quelônios de forma em geral. O capítulo II visa descrever a morfologia do desenvolvimento do *K. scorpioides* em diferentes fases, tendo como base a descrição fenotípica e o capítulo III, validar a utilização de primers heterólogos descritos para *Trachemys scripta*, bem como a expressão do gene PP1 em *K. scorpioides* identificando assim um gene de referência para estudos no gênero *Kinosternon*. Tendo como base a descrição fenotípica, utilizou-se 169 ovos incubados em chocadeiras ajustadas a 26° e 30°C onde foram retirados três exemplares em intervalos regulares de 1 semana até a 25ª semana. Já na parte molecular, utilizou-se 27 amostras de cDNA e DNA total de embriões/fetos de *K. scorpioides* em diferentes estágios embrionários para validação do gene de interesse. Diante dos resultados, a eclosão do ovo se deu em 25 semanas e descrevemos fenotipicamente 54 amostras, a partir dos quais reconhecemos 25 estágios e descrevemos 8 destes. Os elementos morfológicos encontrados se assemelham aos das demais espécies de tartarugas mostrando-se os embriões de fêmeas mais pesados que os de macho ao longo do desenvolvimento. Já a amplificação por PCR convencional da PP1 mostrou resultados positivos em todos os indivíduos amostrados, tanto nas reações realizadas a partir dos cDNAs obtidos, quanto nas amostras de DNA total dos indivíduos adultos e a uniformidade da expressão do gene em diferentes fases foi comprovada a partir da análise da concentração de DNA amplificado. Dessa forma, tanto a amplificação cruzada do primer utilizado, quanto a efetividade de PP1 como um gene de referência foram validados em *K. scorpioides*, fornecendo uma ferramenta importante para os estudos de desenvolvimento embrionário e mecanismos genéticos envolvidos na Determinação Sexual Dependente da Temperatura/TSD.

Palavras-chave: TSD, *Kinosternon scorpioides*, biologia do desenvolvimento, genética.

ABSTRACT

Turtle development biology semi-aquatic *Kinosternon scorpioides* (Testudines, kinosternidae): validation of the reference gene Protein Phosphatase 1 (PP1)

Scientific documentary data available in the databases both Brazilian and world about turtles represent valuable contributions to new studies on reptiles. However, research on turtles still need further support scientific information on issues relating to own biology that lead to taken actions aimed at the conservation of species. Thus, the chapter I aims to make the design of the state of the art for the species *K. scorpioides* in order to contribute to scientific information not only for this species, but the general shape of turtles. Chapter II aims to describe the morphology of the developing *K. scorpioides* in different phases based on the phenotypic description and Chapter III, validate the use of heterologous primers described for *Trachemys scripta* and the expression of the gene in *K. PP1 scorpioides* thus identifying a reference gene for studies on gender *Kinosternon*. Based on the phenotypic description, it used 169 eggs hatched in incubators set at 26 ° to 30 ° C where three copies were taken at regular intervals of 1 week until 25th week. In the molecular part, was used for cDNA and 27 samples of total DNA from embryos / fetuses *K. scorpioides* at different embryonic stages for validation of the gene of interest. Given the results, hatching egg occurred in 25 weeks and described phenotypically 54 samples, from which recognize 25 stages and 8 describe these. The morphological elements were similar to those of the other species of turtles showing up embryos of heavier females the male throughout the development. Since the conventional PCR amplification PP1 showed positive results in all individuals sampled in both the reactions performed from the cDNAs, the total DNA in samples of adult individuals and uniformity of gene expression in different stages was confirmed from analyzing the amplified DNA concentration. Thus, both the cross-amplification primer used, the effectiveness of PP1 as a reference gene in *K. scorpioides* been validated, providing an important tool for studies of embryonic development and genetic mechanisms involved in sex determination Temperature Dependent / TDS .

Keywords: TSD, *Kinosternon scorpioides*, developmental biology, genetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

P.

- Figura 1** - Ocorrência de *Kinosternon scorpioides* na América do Sul. Destaque para as regiões do México, Argentina, Belize, Bolívia, Colômbia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador French Guiana, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguay, Peru, Suriname, Trinidad, Venezuela, e no Brasil com destaque para os estados do Acre, Alagoas, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rondônia, Sergipe e Tocantins (Pritchard & Trebbau 1984; Iverson 1992; Berry & Iverson, 1992; Cabrera & Colantonio 1997; Berry & Iverson 2001; Ciesneros-Heredia, 2006; Carvalho-Jr et al., 2008; Vitt *et al.* 2009; Costa et al., 2010; Silveira et al., 2011; Dijk et al., 2011; Acosta & Palomas, 2013). Adaptado de Dijk et al., (2014)..... 22

CAPÍTULO II

- Figura 1** - Correlação entre o peso do ovo e o período de desenvolvimento embrionário/fetal de *K. scorpioides*..... 42
- Figura 2** - Média do peso (mg) de embriões/fetos *K. scorpioides* avaliados da 2ª a 9ª semana de desenvolvimento mantidos em cativeiro sob diferentes temperaturas de incubação..... 43
- Figura 3** - Embrião de *K. scorpioides* com 2 semanas de desenvolvimento. Destaque para a riqueza vascular (seta)..... 44
- Figura 4** - Embrião de *K. scorpioides* com 3 semanas de desenvolvimento. Observar o dobramento do embrião (C); início de formação da vesícula óptica (V. O) e Intestino primitivo (I. P)..... 44
- Figura 5** - Embrião de *K. scorpioides* com 4 semanas de desenvolvimento. Observar vesículas encefálicas (Prosencéfalo (P); Mesencéfalo (M) e Robencéfalo (R), e Somitos (S)..... 45
- Figura 6** - Embrião de *K. scorpioides* com 5 semanas de desenvolvimento. Observar carapaça em formação (seta); aparecimento nítido da Pupila (P); Cauda (C) e Curvatura Cervical (C.C).. 46
- Figura 7** - Feto de *K. scorpioides* com 7 semanas de desenvolvimento. Observar plastrão aberto centralmente (seta)..... 47
- Figura 8** - Feto de *K. scorpioides* com 8 semanas de desenvolvimento. Observar plastrão inteiramente formado (seta)..... 47
- Figura 9** - (A) Feto de *K. scorpioides* com 9 semanas de desenvolvimento. (B) Observar plastrão e carapaça com os escudos bem marcados. Nesta fase o feto apresenta o padrão fenotípico (seta) da espécie..... 48
- Figura 10** - (A) vista dorsal - padrão fenotípico de *K. scorpioides*, em destaque a carapaça; membros e dígitos (B) vista ventral - padrão fenotípico do plastrão, membros e dígitos observados nos estágios X ao XXV..... 49

CAPÍTULO III

- Figura 1** - Imagem do gel dos produtos de PCR para a Protein Phosphatase 1 (PP1) em diferentes indivíduos de *K. scorpioides*. Os números correspondem às amostras analisadas no estudo..... 64

LISTA DE TABELAS

	P.
CAPÍTULO I	
Tabela 1 - Período de postura de ovos de <i>Kinosternon scorpioides</i> segundo trabalhos já publicados no Brasil.....	26
CAPÍTULO II	
Tabela 1 - Biometria dos ovos de <i>K. scorpioides</i> , obtidos de cativeiro. São Luís-Ma, 2014.....	42
CAPÍTULO III	
Tabela 1 - Primers utilizados em PCR qualitativa.....	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVO.....	13
2.1 Geral.....	13
2.2 Específicos.....	13
APRESENTAÇÃO.....	14
<u>CAPÍTULO I</u>	
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. DESENVOLVIMENTO.....	19
3.1 Taxonomia, História Natural e Distribuição Geográfica.....	20
3.2 Morfologia e Dimorfismo Sexual.....	23
3.3 Aspectos Reprodutivos.....	24
3.4 Criação em Cativeiro – Caracterização dos recintos e do manejo.....	26
4. CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS.....	28
<u>CAPÍTULO II</u>	
1. INTRODUÇÃO.....	38
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1. Local e coleta dos embriões/fetos.....	40
2.2. Descrição dos estágios embrionários/fetal.....	41
3. RESULTADOS.....	41
4. DISCUSSÃO.....	49
5. CONCLUSÃO.....	53
6. AGRADECIMENTOS.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
<u>CAPÍTULO III</u>	
1. INTRODUÇÃO.....	61
2. AGRADECIMENTOS.....	65
REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

Kinosternon scorpioides Linnaeus, 1766 é uma espécie de cágado pertencente à família Kinosternidae de ampla distribuição geográfica podendo ser encontrado desde a Costa Rica até o Norte da Argentina e do Brasil. Nos Estados do Maranhão pode ser conhecida popularmente como “jurará” e do Pará “muçã”. Esta espécie possui um hábito semi-aquático podendo viver em ambientes alagados, mas para se reproduzirem podem alcançar o ambiente terrestre. *K. scorpioides* possui uma ampla variedade reprodutiva no ambiente (CABRERA; COLANTONIO, 1997; CASTRO, 2006).

A família Kinosternidae abrange quatro gêneros (*Claudius*, *Kinosternon*, *Staurotypus*, *Sternotherus*) com 18 espécies descritas para o gênero *Kinosternon* (*K. acutum*, *K. alamosae*, *K. angustipons*, *K. arizonense*, *K. baurii*, *K. chimalhuca*, *K. creaseri*, *K. dunnii*, *K. durangoense*, *K. flavescens*, *K. herreraei*, *K. hirtipes*, *K. integrum*, *K. leucostomum*, *K. oaxacae*, *K. scorpioides*, *K. sonoriense*, *K. subrubrum*) (FRITZ & HAVAS, 2007). Apesar da ampla distribuição, Kinosternidae permanece entre as famílias de quelônios menos estudadas onde destacamos, entre suas espécies, *Kinosternon scorpioides*.

No Estado do Maranhão, *K. scorpioides* é bastante conhecido pelas comunidades locais, principalmente na região da Baixada Maranhense, localizada ao Norte do Estado, onde a espécie têm sido recurso alimentar e fonte de renda de muitas famílias e é possível perceber o reflexo da superexploração. É comercializado nas formas adultas e subadultas, principalmente nos meses de maio a agosto, quando as fêmeas encontram-se ovadas, sobretudo em período reprodutivo (CASTRO, 2006; PEREIRA et al., 2007; BARRETO et al., 2011).

Embora a Lei Nº 5.197 de Proteção à Fauna Brasileira (BRASIL, 1967) proíba a caça de espécies silvestres no Brasil, a espécie continua sendo explorada de forma intensa e ilegal pelas comunidades, inclusive para comércio (CASTRO, 2006).

Quanto ao conhecimento acerca da espécie no Brasil, os dados existentes ainda são insipientes e poucos são os trabalhos descritos sobre a mesma no país. Entre os estudos já realizados, pode-se destacar OLIVEIRA et al, 2009; CARVALHO et al, 2010; CHAVES et al, 2012; ARAÚJO et al, 2013).

Entretanto, no Maranhão, há ainda muitas lacunas; necessitando ainda mais de informações acerca de *K. scorpioides* onde devem ser incentivados, visto que esta espécie constituem-se um importante recurso alimentar e econômico para as comunidades, dada a sua importância e uso na culinária regional, além de ser uma espécie que possui seu futuro

ameaçado pelo homem devido à sua retirada da natureza, tendo como consequência o seu declínio populacional que pode refletir na extinção da espécie (PEREIRA *et al*, 2007).

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 em estudos biológicos. Mesmo 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).

Segundo Ramsey; 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.

Tendo em vista que o jurará *K. scorpioides* é um cágado semi-aquático e que pertence a fauna silvestre maranhense merecendo atenção de estudiosos com o intuito de esclarecer características sobre a biologia reprodutiva da espécie, bem como biologia do desenvolvimento e dados genéticos sobre a espécie no que se refere à genes de referência em estudos com o *K. scorpioides*, o estudo aqui apresentado torna-se necessário uma vez que forneceria informações valiosas sobre o desenvolvimento embrionário da espécie mantida em cativeiro e ainda preencheria lacunas importantes quanto ao genes de referências em estudos com o *K. scorpioides*. Os resultados obtidos tornam-se importantes ainda, pois possibilitará aos pesquisadores, elaborarem estratégias de manejo com ênfase na conservação da espécie em seu ambiente natural, bem como poder ampliar o conhecimento para outros répteis.

2. OBJETIVO

2.1. Geral

- ❖ Descrever a biologia do desenvolvimento da tartaruga semi-aquática *Kinosternon scorpioides* com ênfase na validação do gene de referência Protein Phosphatase 1 (PP1).

2.2. Especificos

- ❖ Fazer o delineamento do estado da arte para a espécie *K. scorpioides*;
- ❖ Descrever a biologia do desenvolvimento do *K. scorpioides* em diferentes fases, tendo como base a descrição fenotípica.
- ❖ Validar a utilização de primers heterologos descritos para *Trachemys scripta*, bem como a expressão do gene PP1 em *K. scorpioides* identificando assim um gene de referência para estudos no gênero *Kinosternon*.

APRESENTAÇÃO

A dissertação está estruturada em três capítulos (2 artigos e 1 nota científica):

CAPÍTULO I – Estado da arte aplicável ao manejo *in situ* e em cativeiro da tartaruga semi-aquática *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766).

Este artigo configura-se de um estudo sobre o estado da arte sobre *K. scorpioides* através de trabalhos já realizados no Brasil e no Estado do Maranhão. Pesquisas relacionadas à morfologia, biologia, dimorfismo sexual, genética, histologia e reprodução são abordadas e discutidas neste capítulo.

CAPÍTULO II – Biologia do desenvolvimento em diferentes fases da tartaruga semi-aquática *Kinosternon scorpioides* (Testudines, Kinosternidae).

Este artigo tem por objetivo a descrição fenotípica de embriões/fetos em diferentes estágios de desenvolvimento de *K. scorpioides* mantidos em cativeiro experimental da UEMA. Análises e descrições macroscópicas foram feitas e as fotografias dos embriões/fetos em diferentes estágios de desenvolvimento são apresentadas para melhor entendimento.

CAPÍTULO III - Validação de primers heterólogos para o gene PP1 (Protein Phosphatase 1) e de seu uso como gene de referência para estudos de desenvolvimento embrionário na tartaruga semi-aquática *K. scorpioides* (Linnaeus, 1766).

Este artigo visa validar a expressão de genes heterólogos descritos para *Trachemys scripta*, bem como seu uso como gene de referência para estudos do desenvolvimento embrionário da espécie *K. scorpioides*.



CAPÍTULO I

Estado da arte aplicável ao manejo *in situ* e em cativeiro da tartaruga semi-aquática
Kinosternon scorpioides (Linnaeus, 1766).

Carlos Alailson Licar Rodrigues¹; Ligia Tchaicka²; Alana Lislea de Sousa¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, autor correspondente (alana@elo.com.br) Bairro Tirirical, São Luís, Maranhão, Brasil. CEP: 65055-970. Caixa Postal 09. ²Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, Universidade Estadual do Maranhão, UEMA.

RESUMO

Dados documentais científicos disponibilizados nas bases de dados tanto brasileira quanto mundial sobre as tartarugas representam valiosas contribuições a novos estudos sobre os répteis, especialmente sobre *K. scorpioides*. Diante disso, para a elaboração de medidas eficientes de proteção e manejo em ambiente natural, bem como o desenvolvimento de projetos de estímulo a criação em cativeiro, necessita-se de uma ampla revisão do conhecimento disponível para a espécie silvestre em questão, logo, esta compilação de dados tem como objetivo o delineamento do estado da arte para a espécie *K. scorpioides*, de forma a contribuir com informações científicas não somente para esta espécie, mas aos quelônios de forma em geral. Para isso, organizou-se uma coletânea de informações sobre a espécie, levando em consideração a sua caracterização e distribuição geográfica, ecologia, morfologia e aspectos reprodutivos a partir das publicações em periódicos especializados. Pesquisas bibliográficas independentes foram realizadas no período de março de 2013 a dezembro de 2014 baseadas em bancos de dados especializados como PubMed, Scielo e Google Acadêmico. Evidencia-se através dos dados apresentados que o conhecimento disponível para essa espécie ainda carece de mais informações, com poucos dados referentes aos aspectos reprodutivos, à biologia, à morfologia, desenvolvimento sexual e distribuição geográfica. Os dados aqui compilados norteiam algumas medidas, especialmente quanto à manutenção e reprodução da espécie em cativeiro a permitem a caracterização ecológica para o delineamento de ações de proteção efetivas.

Palavras-chave: *Kinosternon scorpioides*; tartaruga semi-aquática; manejo; fauna silvestre.

ABSTRACT

Scientific documentary data available in the databases both Brazilian and world about turtles represent valuable contributions to new studies on reptiles, especially on *K. scorpioides*. Therefore, to work out effective measures to protect and manage natural environment as well as the development of stimulus projects to captive breeding there is need of a comprehensive review of the knowledge available to wild species in question, so this data collection aims to design the state of knowledge for the species *K. scorpioides* in order to contribute to scientific information not only for the species, but to the turtles in general. For this, we organized an information collection on the species, taking into consideration the characterization and geographic distribution, ecology, morphology and reproductive aspects from publications in specialized journals. Independent literature searches were carried out from March 2013 to December 2014 based on specialized databases like PubMed, Scielo and Google Scholar. It is evident from the data presented that knowledge available for this species still needs more information with few data on reproductive aspects, biology, morphology, sexual development and geographical distribution. The data compiled here guiding some measures, especially the maintenance and reproduction of the species in captivity to allow ecological characterization for the design of effective protective actions.

Keywords: *Kinosternon scorpioides*; semi-aquatic turtle; management; wildlife.

1. INTRODUÇÃO

Dados documentais científicos disponibilizados nas bases de dados tanto brasileira quanto mundial sobre as tartarugas representam valiosas contribuições a novos estudos sobre os répteis (SOUZA, 2004). Entretanto, existem importantes lacunas quanto às informações disponíveis sobre aspectos da biologia de alguns quelônios, o que dificulta a adoção de medidas protecionistas para espécies nativas dos ecossistemas brasileiros (MARTINS & MOLINA, 2008).

Segundo a Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção vigente (Portarias MMA nº 444/2014 e nº 445/2014), de um total de 1.173 espécies ameaçadas, 80 espécies são de répteis incluindo 31 espécies de quelônios continentais e 5 espécies de tartarugas marinhas (*Carettacaretta*, *Cheloniomydas*, *Dermochelys coriácea*, *Eretmochelysimbricata*, *Lepidochelys olivácea*) (MMA, 2014). Tendo-se o declínio populacional como consequência de diversos fatores, entre eles as ações antrópicas, levando a destruição do hábitat natural através das queimadas, desmatamentos e poluição (PEREIRA et al., 2007).

O número de animais ameaçados é significativo uma vez que atualmente, no mundo, são conhecidas 335 espécies de Testudines, de um total de 453 táxons, incluindo subespécies e a ordem à qual pertencem as tartarugas e os cágados. No Brasil, 36 táxons de testudines estão registrados, com seis espécies endêmicas do Brasil (*Trachemys adiutrix*, *Acantochelys radiolata*, *Hydromedusa maximiliani*, *Mesoclemys hogei*, *Mesoclemys perplexa*, *Mesoclemys tuberculata*). As mais importantes famílias de ocorrência no território brasileiro são Chelidae, com 20 espécies de 20 táxons registrados no mundo; Cheloniidae (4 espécies/4 táxons); Dermochelyidae (1 espécie/1 táxon); Emydidae (2 espécies/2 táxons); Geomydidae (1 espécie/1 táxon); Kinosternidae (1 espécie/1 táxon); Podocnemididae (5 espécies/5 táxons) e Testudinidae (2 espécies/2 táxons) (BÉRNILS & COSTA, 2012; DIJK et al., 2014).

A família Kinosternidae abrange quatro gêneros (*Claudius*, *Kinosternon*, *Staurotypus*, *Sternotherus*) com 18 espécies descritas para o gênero *Kinosternon* (*K. acutum*, *K. alamosae*, *K. angustipons*, *K. arizonense*, *K. baurii*, *K. chimalhuca*, *K. creaseri*, *K. dunnii*, *K. durangoense*, *K. flavescens*, *K. herreraei*, *K. hirtipes*, *K. integrum*, *K. leucostomum*, *K. oaxacae*, *K. scorpioides*, *K. sonoriense*, *K. subrubrum*) (FRITZ & HAVAS, 2007). Apesar da ampla distribuição, Kinosternidae permanece entre as famílias de quelônios, ainda de pouco conhecimento. Dentre seus integrantes, destacamos *K. scorpioides*, espécie da fauna silvestre amazônica.

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. No estado do Pará, onde é chamado de muçã, há relatos de ocorrência na Ilha de Marajó, sendo uma das espécies que mais são exploradas economicamente como fonte de alimento na região (CABRERA & COLANTONIO, 1997; CASTRO, 2006; PEREIRA et al., 2007; BARRETO et al., 2011).

Embora a Lei Nº 5.197 de Proteção à Fauna Brasileira (BRASIL, 1967) proíba a caça de espécies silvestres no Brasil, a espécie continua sendo explorada de forma intensa e ilegal pelas comunidades, inclusive para comércio (CASTRO, 2006).

Tal problemática poderia ser sanada pelo incentivo à criação da espécie em cativeiro. O Instituto Brasileiro do Meio ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) estabelece, através da Instrução Normativa (169/2008) a autorização sobre espécies da fauna silvestre que poderão ser criadas, comercializadas e abatidas de acordo com a finalidade de empreendimentos, onde *K. scorpioides* encontra-se legalmente autorizado para procedimentos de abate.

Para a elaboração de medidas eficientes de proteção e manejo em ambiente natural, bem como o desenvolvimento de projetos de estímulo a criação em cativeiro, necessita-se de uma ampla revisão do conhecimento disponível para a espécie silvestre em questão. Portanto, esta compilação de dados tem como objetivo o delineamento do estado da arte para a espécie *K. scorpioides*, de forma a contribuir com informações científicas não somente para esta espécie, mas aos quelônios de forma em geral.

2. DESENVOLVIMENTO

Pesquisas bibliográficas independentes foram realizadas no período de março de 2013 a dezembro de 2014 baseadas em bancos de dados especializados como PubMed, Scielo e Google Acadêmico a partir de palavras-chave relacionadas como *K. scorpioides*, Maranhão, tartaruga, quelônio, baixada maranhense. Com isso, organizou-se uma coletânea de informações sobre a espécie, levando em consideração a sua caracterização e distribuição geográfica, ecologia, morfologia e aspectos reprodutivos. Os trabalhos foram obtidos a partir de bases de dados especializadas. Além das informações obtidas nas bases de dados, estudos

adicionais foram identificados em bibliotecas de universidades. Artigos científicos, Dissertações e Teses de doutorado também foram analisados. Para os critérios de inclusão, o título e os resumos dos artigos selecionados eram averiguados, sendo analisados na íntegra, os artigos cujos resumos não apresentavam clareza nas informações prestadas para uma decisão de exclusão da revisão.

Com vistas a caracterizar a criação em cativeiro, adicionamos aos dados obtidos da literatura informações geradas durante sete anos de experiência nessa prática na Universidade Estadual do Maranhão.

2.1. Taxonomia, História Natural e Distribuição Geográfica

O jurará (*K. scorpioides*) possui a seguinte classificação taxonômica de acordo com Iverson (1992); Berry & Iverson (2001) e Dijk et al (2014).

Reino Animalia

Filo Chordata

Subfilo Vertebrata

Superclasse Tetrápoda

Classe Reptilia

Ordem Chelonia

Subordem Cryptodira

Família Kinosternidae

Subfamília Kinosterninae

Gênero *Kinosternon* (Spix, 1824)

Espécie *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766)

K. s. scorpioides (Linnaeus, 1766)

K. s. albogulare (Duméril & Bocourt, 1870)

K. s. cruentatum (Duméril & Bibron in Duméril & Duméril, 1851)

K. s. abaxillare (Baur in Steineger, 1925)

K. s. carajensis (Cunha, 1970)

K. s. seriei (Freiberg, 1936)

K. s. pachyurum (Muller & Hellmich, 1936)

K. s. integrum (Fróes, 1957)

K. s. panamense (Schmidt, 1946)

K. scorpioides possui comportamentos importantes que caracterizam sua reprodução, ecologia e biologia. Estes animais vivem em grupos e apresenta tamanho pequeno podendo atingir até 15 cm de comprimento da carapaça. Costumam caminhar em passos lentos e compartilham diferentes ambientes ao mesmo tempo, o aquático e o terrestre, sendo, portanto, tartarugas semi-aquáticas de água-doce. Neste sentido, estudos têm demonstrado que a configuração do tamanho do casco e a morfologia das fêmeas da espécie podem sofrer diferenciações em ambientes cujas características ecológicas são distintas (ROCHA & MOLINA, 1987; DELDUQUE, 2000). Habitam áreas que permanecem alagadas em período chuvoso, ou regiões alagadas permanentemente. Barreto et al., (2009) em pesquisa realizada na Ilha de Curupu/Ma demonstraram que *K. scorpioides* pode também ser encontrada em áreas de praia, caracterizadas por dunas de passagem e gramíneas e por apresentar água salgada.

Como característica biológica da espécie, 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).

Por habitar regiões de lodo, *K. scorpioides* podem ser conhecidos ainda, como “tartarugas do lodo” e liberam substância odoríferas através de sua superfície corporal quando são manuseadas ou molestadas (ROCHA & MOLINA, 1990). São animais carnívoros e ovíparos, tendo sua dieta diversificada, estando presentes girinos, peixes, materiais em decomposição e alguns vegetais (PRITCHARD, 1979).

Segundo a The Reptiles Database (2014), *K. scorpioides* possui ampla distribuição mundial, tendo ocorrência no México, Guatemala, Belize, Salvador, Honduras, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Equador, Venezuela, Guiana Francesa, Argentina, Paraguai, Bolívia, Peru, Suriname e Trindade. Algumas publicações trazem informações quanto à presença da espécie *K. scorpioides* na América do Sul e em alguns países da América Central (CISNEROS-HEREDIA, 2006; BERRY & IVERSON, 2011; ACOSTA et al., 2013).

No Brasil, ocorrem nos estados do Mato Grosso, Rondônia, Amazônia e Pará (COSTA et al., 2010). Ilha de São Luís (Maranhão), rio Tapajós (Pará) (PRITCHARD & TREBBAU, 1984). Manicoré, rio Madeira (Amazonas) (IVERSON, 1992; CABRERA & COLANTONIO 1997; BERRY & IVERSON 2001); Serra Sul, Serra dos Carajás (Pará) (CARVALHO-JR et al., 2008); Rio Cristalino (Mato Grosso) (VITT et al., 2009); Cachoeira do Nazaré, Rio Machado (Rondônia) (CABRERA & COLANTONIO, 1997; BERRY & IVERSON 2001),

Aripuanã, Rio Aripuanã (Mato Grosso) (COSTA et al., 2010); Rio Tapirapé (Mato Grosso) (PRITCHARD & TREBBAU 1984; IVERSON 1992; CABRERA & COLANTONIO 1997) e no município de Porteirinha (Minas Gerais) (SILVEIRA et al., 2011) (Figura 1).



Figura 1: Ocorrência de *Kinosternon scorpioides* na América do Sul. Destaque para as regiões do México, Argentina, Belize, Bolívia, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador French Guiana, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguay, Peru, Suriname, Trinidad, Venezuela, e no Brasil com destaque para os estados do Acre, Alagoas, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rondônia, Sergipe e Tocantins (Pritchard&Trebbaud 1984; Iverson 1992; Berry & Iverson, 1992; Cabrera & Colantonio 1997; Berry & Iverson 2001; Ciesneros-Heredia, 2006; Carvalho-Jret al.,2008; Vittet al. 2009; Costa et al., 2010; Silveira et al., 2011; Dijk et al., 2011; Acosta & Palomas, 2013). **Adaptado de Dijk et al., (2014).**

Estudos envolvendo marcadores moleculares indicam a existência de considerável variabilidade genética na espécie quando estudados *loci* RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) de uma população de *K. scorpioides* do Banco de Germoplasma Animal da Amazônia Oriental (animais de Salvaterra na Ilha do Marajó no Estado do Pará). Os autores desse estudo reforçam a importância de estudos de conservação da mesma, tanto em cativeiro, quanto no ambiente natural (SILVA et al., 2011).

2.2. Morfologia e Dimorfismo Sexual

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 e da cabeça e pescoço. Segundo Castro (2006) e Pereira et al. (2007) alguns caracteres morfológicos são bastante diferenciados entre os sexos, tendo, de forma geral, o tamanho médio da carapaça e plastrão das fêmeas entre 15,26 e 13,35cm, e os machos variam de 14,79 e 12,30 cm, sendo, portanto menores que as fêmeas. Já Delduque (2000) afirma que o tamanho da carapaça desta espécie tem entre 15,0 cm e 27,0 cm com plastrão de coloração variável, com placas móveis. O peso também pode variar entre os sexos: as fêmeas são mais pesadas apresentando peso médio de 430,08g e os machos de 315,05g (CASTRO, 2006 e PEREIRA et al., 2007).

Estudos realizados por Brambleet al., (1984) demonstraram que o desenvolvimento relativo do plastrão de *Kinosternon* pode ser fortemente influenciado pelas condições ambientais locais do indivíduo, principalmente ao seu habitat aquático. As espécies de ambientes alagadiços, perenes e rasos possuem cascos mais achatados de modo a se esconder do predador, enquanto as de ambientes mais profundos os cascos são maiores e mais alto (ACUNÃ-MESEN, 1994). O nome da espécie foi originado a partir da cauda do animal, que possui aparentemente um formato de ferrão assemelhando ao do escorpião, daí o nome *scorpioides*. Em machos, a cauda apresenta-se mais longa facilitando a introdução do pênis na cloaca da fêmea e dela o apoio na fixação até a ejaculação e o plastrão apresenta uma depressão côncava para facilitar a monta e a cópula com a fêmea, sendo nela a cauda mais curta e o plastrão reto. Os machos possuem unha córnea, utilizada para segurar a fêmea no momento da cópula (CASTRO, 2006; PEREIRA et al., 2007).

A morfologia do fígado de *K. scorpioides* foi estudado por Machado-Júnior et al., (2005) que observaram estruturas robustas e delimitadas, órgão volumoso, de coloração marrom purpuro, posicionado crânio-medialmente em relação ao coração e com o intestino delgado caudomedialmente. Possui cinco lobos sendo dois à esquerda e três à direita do plano médio do corpo, com a vesícula biliar posicionada entre os lobos da direita, diferindo de indivíduos próximos evolutivamente como as salamandras, cobras e outros vertebrados.

Estudo histológico e histoquímico do esôfago de *K. scorpioides* foi realizado por Pereira et al. (2005), os autores caracterizaram e relataram a presença de estruturas importantes quanto à composição das regiões esofágicas constituídas das túnicas mucosa, submucosa, muscular e adventícia ou serosa. Na túnica mucosa observaram células calciformes interpostas entre as células epiteliais ciliadas, células prismáticas com diferentes morfologias. A muscular da mucosa proeminente e formada por duas camadas de fibras musculares lisas. Enquanto a túnica submucosa constituída de tecido conjuntivo com fibras colágenas infiltradas por linfócitos ricos em vasos e plexos nervosos. Túnica muscular observada sendo constituída de fibras musculares lisas e composta por camadas muscular circular interna e longitudinal externa. A túnica adventícia constituída de tecido conjuntivo frouxo, células adiposa, vasos sanguíneos e terminações nervosas.

No que se refere aos órgãos que participam do sistema circulatório de *K. scorpioides*, a aorta é dupla em sua origem na base do coração (artéria esquerda e direita). Elas deixam o coração pela parte ventral e segue neste sentido até a porção caudal do corpo do animal, com emissão de ramos viscerais pela aorta esquerda (OLIVEIRA et al., 2009).

Segundo Machado-Júnior et al. (2006) e Carvalho et al. (2010), os órgãos sexuais destes répteis são semelhantes aos das demais classes de tartarugas: o aparelho genital feminino é composto por um par de ovários e um de ovidutos. Os machos possuem um par de testículos de formato ovóide, coloração amarela em tons variados entre o claro ao ouro, conforme o período reprodutivo, posicionados assimetricamente no interior da cavidade celomática e fixados pelo mesórquio e o mesocólon, seguidos de epidídimos convolutos e contínuos aos ductos deferentes, que se abrem no interior da cloaca, com o pênis apresentando formato sulcado ventralmente, composto de raiz, corpo com dois corpos cavernosos, separados por um sulco, por onde pode escorrer o sêmen e a glândula apresenta-se enegrecida, ausência de uretra peniana.

2.3. Aspectos Reprodutivos

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 *Kinosternon*, assim como para os demais répteis, é a temperatura, com o processo de incubação dos ovos, bem como a determinação sexual dos filhotes, controlado por esse fator (FERREIRA-JÚNIOR, 2009; VIANA et al., 2013).

Em *K. scorpioides* de cativeiro, foi possível observar que o comportamento de acasalamento ocorre no período chuvoso, não sendo observado no período seco. A cópula

desses animais 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 (CHAVES, 2011). 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.

Esse dado contrasta com a descrição de que os ovários das fêmeas mostraram-se sexualmente maduros durante o ano todo (CHAVES et al., 2012). Por outro lado, em machos, é relatada a variação sazonal na morfologia do epidídimo (sua organização em rede testis, ducto eferente e ducto epididimário) e na produção espermática. Diferenças na morfometria dos diâmetros tubular e luminal foram constatadas sendo as maiores médias de tamanho encontradas no período chuvoso que corresponde ao período reprodutivo para a *K. scorpioides*. A produção espermática foi evidenciada durante o ano todo, porém é maior durante a estação chuvosa. Relatos sobre a produção espermática em *K. scorpioides* mostram que as Células de Sertoli (CS) possuem papel primordial na produção, bem como a eficiência e duração da produção de espermatozoides. Em machos o peso corporal, tamanho das gônadas, tamanho e morfologia dos testículos e concentrações hormonais estão relacionados às condições ambientais que, refletem na sazonalidade reprodutiva da espécie (VIANA et al., 2013, 2014a; 2014b; 2014c; SOUSA et al., 2014)

Costa et al., (2009) acompanharam os eventos do ciclo ovariano de *K. scorpioides* e verificaram o desenvolvimento de folículos pré-ovulatórios entre os meses de outubro/2005 a março/2006. Em meados de abril a agosto/2006 observaram a deposição de cálcio em um período correspondente ao final da estação chuvosa e início da estação seca.

Quanto à ovipostura de animais criados em cativeiro, Chaves (2011) relata que as fêmeas podem por ovos o ano todo. Porém Silva (2011) afirma que a postura das fêmeas mantidas em cativeiro ocorre prioritariamente no período seco, não corroborando com os dados citados acima, confirmando em seus achados, a sazonalidade reprodutiva da espécie. Diversos trabalhos mostram períodos de postura dos ovos de *K. scorpioides* diferenciados. A tabela abaixo mostra os meses de postura dos ovos pelas fêmeas em diferentes regiões geográficas e ambientes (Tabela 1).

Tabela 1: Período de postura de ovos de *Kinosternon scorpioides* em cativeiro.

Período de postura	Hábitat de desova	Fonte bibliográfica
Abril a janeiro	Cativeiro	Araújo (2007)
Mai a outubro	Cativeiro	Silva et al., (2006)
Abril a agosto	Parque Zoológico do Museu Paraense Emílio Goeldi.	Castro (2006)
Fevereiro a dezembro	Jardim Zoológico de São Paulo (SP).	Basho e Molina (2000)
Março a agosto	Jardim Zoológico de São Paulo (SP).	Rocha & Molina (1990)

Fonte: Adaptado de Araújo (2009)

Para Castro (2006) a fêmea pode depositar de 8 a 9 ovos a cada postura, em solo argiloso e estes eclodem em aproximadamente 150 dias. Araújo (2009) relata que o tamanho das fêmeas pode estar relacionado à frequência de postura dos ovos, ou seja, fêmeas maiores possuirão maior frequência de postura em relação às fêmeas menores. A temperatura influencia o período de incubação, a partir da troca de calor entre os corpos. A maior taxa de desenvolvimento embrionário ocorre 50% acima da temperatura média entre temperaturas que define machos e fêmeas, neste sentido, o desenvolvimento embrionário se relaciona positivamente com a temperatura, pois quanto maior a temperatura, maior será a taxa de desenvolvimento embrionário (ACKERMAN, 1997 e FERREIRA-JÚNIOR, 2009;).

A determinação do sexo em tartarugas pode ser sincronizada pela influência de fatores externos, tais como a temperatura de incubação nas primeiras fases de desenvolvimento embrionário, que corresponde ao primeiro terço. É nessa fase que o processo é ainda reversível (BULL & VOGT, 1981; MROSOVSKY & PIEAU, 1991; MOELLER, 2013). A temperatura determinante dos sexos em *K. scorpioides* é relatada por Ferreira-Júnior (2009) indicando que machos são desenvolvidos em temperaturas próximas a 26°C e as fêmeas em 30°C.

2.4. Criação em Cativeiro – Caracterização dos recintos e do manejo

O cativeiro experimental teve sua autorização no ano de 2008, pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis do Maranhão/IBAMA-MA (1899339/2008) e encontra-se localizado no prédio do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão (Campus Paulo VI, São Luís - MA) sob licença Nº 1899339/2008/IBAMA. É um espaço destinado ao desenvolvimento de pesquisas sobre a biologia da espécie *K. scorpioides* em cativeiro. Dispõe de uma área total de 159.92m² e é

composto por um complexo de cinco baias de paredes teladas em ferro galvanizado, exceto no teto. Cada baia possui uma área de 13,94m², sendo parte de uma área total construída de aproximadamente 91m², tendo ainda uma área livre de aproximadamente 68m². Cada baia tem um tanque de alvenaria revestido em cerâmica, rampa de acesso aos animais, água disponível e escoamento de drenagem. Dentro do cativeiro é possível encontrar árvores, cascalho e areia de forma a permitir uma ambiência próxima ao habitat natural da espécie. Atualmente o criadouro consta de um rebanho de 112 animais entre machos (31) e fêmeas (81) distribuídos conforme o tamanho entre os juvenis e adultos. São manejados diariamente na renovação da água dos tanques, alimentados e acompanhados quanto a sua sanidade. Os animais são identificados em fichas individuais e possuem marcações. Todas as pesquisas executadas tem autorização para atividades com finalidade científica fornecido pelo ICMBio/SISBIO nº 36884-2/2013-2015. A alimentação dos animais ocorre uma vez por dia, de preferência, no turno da manhã., durante o procedimento de limpeza todos os animais são retirados do interior das baias e não são utiliza-se produtos de limpeza como sabão, detergentes, entre outros. O ambiente possui grande ventilação natural e área aberta. As fêmeas, em tempo de postura, são monitoradas para que seus ovos sejam manuseados em chocadeiras artificiais, outros, porém são mantidos em ambiente de cativeiro para nascimento. O cativeiro é monitorado diariamente, e os animais, após nascimento em cativeiro, são retirados de modo a evitar que venham a óbito, ou até mesmo machucados por outros indivíduos no interior do viveiro.

3. CONCLUSÃO

O conhecimento de aspectos da história natural de uma espécie é primeiro passo para o manejo adequado de seus estoques, e deve direcionar programas de conservação eficientes e possíveis. *K. scorpiodes*, por sua importância econômica e cultural nas comunidades Amazônicas, bem como por sua ampla exploração, carece de programas que cumpram esses objetivos. Evidencia-se através dos dados apresentados que o conhecimento disponível para essa espécie ainda carece de mais informações, com poucos dados referentes aos aspectos reprodutivos, à biologia, à morfologia, desenvolvimento sexual e distribuição geográfica. Os dados aqui compilados norteiam algumas medidas, especialmente quanto à manutenção e reprodução da espécie em cativeiro a permitem uma caracterização ecológica preliminar para o delineamento de ações de proteção efetivas.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, J. L.; CALAMANTE, C.; PALOMAS, S. *Kinosternon scorpioides scorpioides* (Linnaeus, 1766). Primer registro para la provincia del chaco (República Argentina). **Cuadernos de Herpetología**, 27(2):00-00, 2013.

ACUÑA-MESEN, R. A. Variación morfométrica y características ecológicas del habitat de la tortuga candado *Kinosternon scorpioides* en Costa Rica (Chelonia, Kinosternidae). **Revista Brasileira de Biología**, 54(3):537-47, 1994.

ACKERMAN, R. A. The Nest environment and the Embryonic Development of Sea Turtles. (1997). **In:** LUTZ, P. L. & MUSICK, J. A. The Biology of Sea Turtles. New York CRC Press. pp. 83–106.

ARAÚJO, J. C. Muçua (*Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766): aspectos teóricos e desempenho reprodutivo de plantéis selecionados para criação em cativeiro (Resultados preliminares). 2007. 57 p. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Bacharelado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém.

ARAÚJO, J. C. Parâmetros produtivos e qualidade de ovos de muçuas (*Kinosternon scorpioides*) submetidos a manejo alimentar diferenciado. 2009. 94 p. **Dissertação** (mestrado) – Universidade Federal de Lavras – Lavras: UFLA.

BARRETO, L.; LIMA, L. C.; BARBOSA, S. Observations on the Ecology of *Trachemys adiutrix* and *Kinosternon scorpioides* on Curupu Island, Brazil. **Herpetological Review**, 40(3), 283–286, 2009.

BARRETO, L.; RIBEIRO, E. S.; NASCIMENTO, M. C. Caracterização da herpetofauna em áreas da Amazônia do Maranhão. (2011). **In:** MARTINS, M. B.; OLIVEIRA, T. G. Amazônia Maranhense: Diversidade e Conservação. Belém: MPEG, 2011. 328 p.

BASHO, A. Y. & MOLINA, F. B. Conservação “Ex-Situ” de quelônios neotropicais: biologia reprodutiva do Muçua, *Kinosternon scorpioides scorpioides* (Reptilia, Testudines, Kinosternidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, 67(2):1-145, 2000. Suplemento.

BELO, V. S.; STRUCHINER, C. J.; WERNECK, G. L.; BARBOSA, D. S.; OLIVEIRA, R. B.; NETO, R. G. T.; SILVA, E. S. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, 195:1-13, 2013.

BÉRNILS, R. S. & COSTA, H. C. Répteis brasileiros: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, 3(3):74-75, 2012.

BERRY, J. F. & IVERSON, J. B. *Kinosternon scorpioides* (Linnaeu, 1766) – Scorpion Mud Turtle. (2011). In: RHODIN, A. G. J.; PRITCHARD, P. C. H.; VAN DIJK, P. P.; SAUMURE, R. A.; BERRY, J. F.; IVERSON, J. B. *Kinosternon scorpioides*. **Chelonian Research Foundation**, 5(1):063.1-063.15. 2011.

BERRY, J. F. & J. B. IVERSON. *Kinosternon scorpioides*. **Catalogue of American Amphibians and Reptiles**, 725: 1-11. 2001.

BRAMBLE D. M.; HUTCHISON, J. H.; LEAGLER J. M. Kinosternid shell kinesis: Structure, function and evolution. **Copeia**, 2:456- 475. 1984.

BRASIL. Lei nº 5.197, de 03 de janeiro de 1967. **Dispõe sobre a proteção à fauna e dá outras providências**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, v. 1, 05 de janeiro de 1967. Seção 1, p. 177.

BULL, J. J. & VOGT, R. C. Temperature-sensitive periods of sex determination in Emydid turtles. **Journal of Experimental Zoology**, 218: 435-440. 1981.

CABRERA, M. R.; COLANTONIO, S. E. Taxonomic revision of the South American subspecies of the turtle *Kinosternon scorpioides*. **Journal Herpetology**, 31(4):507-513, 1997.

CARVALHO, R. C.; OLIVEIRA, S. C. R.; BOMBONATO, P. P.; OLIVEIRA, A. O.; SOUSA, A. L. Morfologia dos órgãos genitais masculinos do jurará *Kinosternon scorpioides* (Chelonia: Kinosternidae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 30(4):289-294, 2010.

CARVALHO-JR, E. A. R., CARVALHO-NETO, C. S.; PASCHOALINI, E. L. Diet of *Kinosternon scorpioides* in Serra dos Carajás, Eastern Amazonia. **Herpetological Review**, 39(3): 283-285. 2008.

CASTRO, A. B. Biologia reprodutiva e crescimento do muçua *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1776) em cativeiro. Belém. 2006. 101 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Pará: UFPA.

CHAVES, E. P.; OLIVEIRA, S. C. R.; ARAÚJO, L. P. F.; OLIVEIRA, A. S.; MIGLINO, M. A.; ABREU-SILVA, A. L.; MELO, F. A.; SOUSA, A. L. Morphological aspects of the ovaries of turtle *Kinosternon scorpioides* raised in captivity. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(7):667-671, 2012.

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. An unbiased approach to identify genes involved in development in a turtle with temperature-dependent sex Determination. **BMC Genomics**, 13:308, 2012.

CIENEROS-HEREDIA, D. F. Turtle of the Biodiversity Station with remarks on the diversity and distribution of the Testudines from ecuador. **Biota Neotropica**, 6(1). 2006.

COSTA, F. B.; ALVES, F. R.; COSTA, A. P.; BARROS, A. C. E.; GUERRA, P. C.; SOUSA, A. L.; OLIVEIRA, A. S. Ultrasonographic and radiographic determination of egg development of jurarás (*Kinosternonscorpioides*) in captivity. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29(10):841-846, 2009.

COSTA, H. C.; MOLINA, F. B.; SÃO-PEDRO, V. A.; FEIO, R. N. Reptilia, Testudines, Kinosternidae, *Kinosternon scorpioides scorpioides* (Linnaeus, 1766): Distribution extension. **CheckList**, 6(2), 2010.

- DELDUQUE, M. **Ficha do bicho; muçuã**. Globo Rural. n°. 176, p. 83-84, 2000.
- 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. **Chelonian Research Monographs**,7(5):329-479, 2014
- FERREIRA-JÚNIOR, P. D. Aspectos ecológicos da determinação sexual em tartarugas. **ActaAmazonica**, 39(1):139-154, 2009.
- FREEDBERG, S.; NELSON, C. E; EWERT, M. A. Estradiol 17 β Induces Lasting Sex Reversal at Male-Producing Temperatures in Kinosternid Turtles. **Journal of Herpetology**, 40(1):95-98, 2006.
- FRITZ, U. & HAVAS, P. Checklist of Chelonians of the World. **Vertebrate Zoology**, 57(2):149-368, 2007.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). Instrução Normativa Ibama, 169, de 20 de fevereiro de 2008. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 21 de fevereiro de 2008, Seção 1, p. 57-59. Disponível em <www.ibama.gov.br/category/1?download=66:169-2008>. Acesso em 26 de fevereiro de 2015.
- IVERSON, J. B. A revised checklist with distribution maps of the turtles of the world. Richmond: Privately Printed. 374 p. 1992.
- KETTLEWELL, J. R.; RAYMOND, C. S.; ZARKOWER, D. Temperature-Dependent Expression of Turtle Dmrt1 Prior to Sexual Differentiation. **Genesis**, 26:174-178, 2000.
- MACHADO-JÚNIOR, A. A. N.; SOUSA, A. L.; CARVALHO, M. A. M.; SANTOS, F. C. F.; ALVES, F. R. Anatomia do fígado e vias bilíferas do muçuã. **Archives of Veterinary Science**, 10(2):10-15, 2005.

MACHADO-JÚNIOR, A. A. N.; SOUSA, A. L.; SANTOS, F. C. F.; PEREIRA, J. G. Morfologia dos órgãos genitais femininos do muçã (*Kinosternon scorpioides*). **Archives of Veterinary Science**, 11(2):25-29, 2006.

MANOLAKOU, P.; LAVRANOS, G.; ANGELOPOULOU, R. Molecular patterns of sex determination in the animal kingdom: a comparative study of the biology of reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 4:59, 2006.

MARTINS, M. & MOLINA, F. B. Panorama geral dos répteis ameaçados no Brasil. **In:** MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. Livro Vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. 1 ed. – Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, v. 2, 2008, 1420 p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). (2014). Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). **Espécies Ameaçadas – Lista 2014**. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies.html>. Acesso em 28 de fevereiro de 2015.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014. **Fauna Ameaçada**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, nº 245, 18 de dezembro de 2014. Seção 1, p. 121. Disponível em: <www.icmbio.gov.br>. Acesso em 28 de fevereiro de 2015.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014. **Peixes e invertebrados aquáticos ameaçados**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, nº 245, 18 de dezembro de 2014. Seção 1, p. 126. Disponível em: <www.icmbio.gov.br>. Acesso em 28 de fevereiro de 2015.

MOLLER, K. T. (2013). **Temperature-Dependent Sex Determination in Reptiles**. Embryo Project Encyclopedia. Disponível em: <<http://embryo.asu.edu/handle/10776/4214>>. Acesso em 04 de março de 2015.

MOROSOVSKY, N. & PIEAU, C. Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. **Amphibia-Reptilia**, 12: 169–179. 1991.

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

OLIVEIRA, S. C. R.; MACHADO JÚNIOR, A. A. N.; CARVALHO, R. C.; PEREIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. S.; SOUSA, A. L. Distribuição arterial dos principais vasos da cavidade celomática em *Kinosternon scorpioides scorpioides*. **Ciência Animal Brasileira**, 10(3):893-898, 2009.

PEREIRA, J.G.; FONSECA, C. C.; MENIN, E.; NEVES, M. T. D. Estudo histológico e histoquímico do esôfago do muçã *Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766 (Reptilia, Chelonia, Kinosternidae). **Arquivos de Ciências Veterinária e Zoologia. UNIPAR**, 8(1): p.3-10, 2005.

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.**

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.

PRICHARD, P. C. H. **Encyclopedia of turtles**. New Jersey: T.F.H, 1979. p. 326.

PRITCHARD, P. H. C. & TREBBAU, P. *Kinosternon scorpioides scorpioides* (Linnaeus,1766). **In: The turtles of Venezuela, Society for the Study of Amphibians and Reptiles. Ohio: Oxford, p. 239-248, 1984. 414 p.**

ROCHA, M. B. & MOLINA, F. B. Algumas observações sobre a biologia e manejo do muçuã. **Aquacultura**, 2:25-26, 1987.

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

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

SILVA, A. S. L.; PALHA, M. D. C.; RIBEIRO, A. S. S.; ARAÚJO, J. C.; BASTOS, P. C. R.; CASTRO, A. B.; OLIVEIRA, F. A. O. Desempenho reprodutivo de muçuãs (*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.

SILVA, C. S.; COSTA, M. R. T.; FORTES, A. C. R.; MARQUES, L. C.; AGUIAR, J. F.; MARQUES, J. R. F. Variabilidade genética em muçuã utilizando marcadores moleculares RAPD. **Revista de Ciências Agrárias: Especial Sustentabilidade**, 54(3):307-313, 2011. Trimestral.

SILVEIRA, A. L.; BALESTRA, R. M.; FERREIRA, D. I.; LUZ, V. L. F.; PENA, A. P.; COUTINHO, E. Primeiro registro documentado de *Kinosternon scorpioides scorpioides* (Reptilia, testudines, Kinosternidae) no Estado de Minas Gerais, Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecias**, 13(1,2,3):249-251, 2011.

SOUSA, A. L.; CAMPOS-JUNIOR, P. H.; COSTA, G. M.; FRANÇA, L. R. Spermatogenic cycle length and sperm production in the freshwater turtle *Kinosternon scorpioides*. **Biology and Reproduction**, 90(2):1-10, 2014.

SOUZA, F. L. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). **Phyllomedusa**, 3(1):15-27, 2004.

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.

THE REPTILES DATABASE (2014). *Kinosternon scorpioides*, 1766. Disponível em: <<http://reptiles-database.reptarium.cz/species>>. Acesso em 15 de dezembro de 2014.

VIANA, D. C.; RUI, L. A.; MIGLINO, M. A.; ARAUJO, L. P. F.; OLIVEIRA, A. S.; SOUSA, A. L. Morphological study of epididymides the scorpion mud turtle in natural habitat (*Kinosternon scorpioides* – Linnaeus, 1766). **Biotemas**, 26(2):153-162, 2013.

VIANA, D. C.; SANTOS, A. C. DOS.; CHAVES, L. F. A.; OLIVEIRA, A. S.; ASSÍS NETO, A. C. DE.; SOUSA, A. L. DE.; Body and testicular biometric parameters of the scorpion mud turtle (*Kinosternon scorpioides*). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 36(4):477-481, 2014a.

VIANA, D. C.; RUI, L. A.; SANTOS, A. C. DOS.; MIGLINO, M. A.; ASSIS NETO, A. C. DE.; ARAUJO, L. P. F.; OLIVEIRA, A. S.; SOUSA, A. L. Seasonal morphological variation of the vas deferens of scorpion mud turtle (*Kinosternon scorpioides*). **Biota Neotropica**, 14(3):1-5, 2014b.

VIANA, D. C.; ANUNCIACÃO, A. R. A.; SANTOS, H. C.; OLIVEIRA, C. A.; MIGLINO, M. A.; ASSIS NETO, A. C.; OLIVEIRA, A. S.; SOUSA, A. L. Plasma Testosterone and Seasonal Reproductive Changes in the Scorpion Mud Turtle. **Pakistan Journal of Zoology**, 46(6):1641-1650, 2014c.

VITT, L.J., F.G.R. FRANÇA AND G.R. COLLI. 2009. Reptiles of lower Cristalino river area. Eletronic Database. Disponível em: <<http://www.omnh.ou.edu/personnel/herpetology/vitt/cerrado/cristalino/>>. Universidade of Oklahoma and Universidade de Brasília, 2009.

WESTERN, P.; HARRY, J. L.; GRAVES, J. A. M.; SINCLAIR, A. H. Temperature-dependent sex determination in the American alligator: expression of SF1, WT1 and DAX1 during gonadogenesis. **Gene**, 241(2):223-232, 2000.



CAPÍTULO II

Biologia do desenvolvimento da tartaruga semi-aquática *Kinosternon scorpioides*
(Testudines, Kinosternidae)

Carlos Alailson Licar Rodrigues¹; Ligia Tchaicka²; Alana Lislea de Sousa¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão/UEMA, Campus Paulo VI, Tirirical, São Luís, Maranhão, Brasil. ²Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, Universidade Estadual do Maranhão, UEMA.

RESUMO

A espécie *Kinosternon scorpioides* possui hábito semi-aquático, ampla distribuição geográfica e determinação do sexo dependente da temperatura de incubação. Com o objetivo de descrever a biologia do desenvolvimento do *K. scorpioides* em diferentes fases, tendo como base a descrição fenotípica, utilizou-se 169 ovos incubados em chocadeiras ajustadas a 26° e 30°C. Foram retirados três exemplares em intervalos regulares de 1 semana até a 25ª semana. Os ovos e embriões/fetos foram pesados e mensurados. A eclosão do ovo se deu em 25 semanas (175 dias) e descrevemos fenotipicamente 54 amostras, a partir dos quais reconhecemos 25 estágios e descrevemos 8 destes (2ª a 9ª semanas). Os elementos morfológicos encontrados se assemelham aos das demais espécies de tartarugas mostrando-se os embriões de fêmeas mais pesados que os de macho ao longo do desenvolvimento.

Palavras-chaves: Biologia do desenvolvimento; *Kinosternon scorpioides*; tartaruga.

ABSTRACT

The species *Kinosternon scorpioides* has semi-aquático habit, wide geographical distribution and temperature –dependent sex determination. In order to describe the morphology of the developing *K. scorpioides* in different phases, based on the phenotypic description, we used 169 eggs in incubators adjusted at 26 ° C and 30 ° C. We removed three embryos at regular intervals of one week to the 25th week. The eggs and embryos / fetuses were weighed and measured. The egg hatching happened at 25 weeks (175 days) and we described 54 embryos, reconizing 25 stages and describing 8 stages of them (2 to 9 weeks). The morphological elements found are similar to the other species of turtles and the females were more heavy than males during the development.

Keywords: developmental biology; *Kinosternon scorpioides*; turtle.

1. INTRODUÇÃO

Os Testudines constituem-se de um grupo que abrange animais que compõem a fauna de vertebrados existentes nos ambientes marinho (tartarugas), de água-doce (tartarugas e cágados) e terrestre (jabutis). São animais que apresentam características peculiares, possuindo cinturas escapular e pélvica dentro de um casco formado por placas ósseas com as suturas cobertas por um mosaico de escudos córneos epidérmicos. Ao longo do processo evolutivo esta estrutura protetora passou por mudanças, sendo formado por uma porção dorsal, a carapaça, e uma porção ventral, o plastrão (BUJES, 2008 e BUJES, 2010). São importantes componentes da cadeia trófica exercendo grande influência na qualidade ambiental, nas funções vitais do ambiente e na ciclagem de nutrientes (MOLL & MOLL, 2004).

Atualmente é uma ordem que compreende duas subordens, *Pleurodira* e *Cryptodira* entre as quais estão distribuídas 14 famílias (Chelidae, Podocnemididae, Pelomedusidae, Chelydridae, Platysternidae, Cheloniidae, Dermochelyidae, Dermatemydidae, Kinosternidae, Geoemydidae, Emydidae, Testudinidae, Carettochelyidae e Trionychidae) com 317 espécies descritas (GUILLON et al., 2012).

No Brasil, segundo a Lista 2014 de espécies ameaçadas (Portarias MMA n° 444/2014 e n° 445/2014) existe 415 espécies de répteis ameaçados, entre os quais, 31 espécies de quelônios continentais, entre os quais se destaca *K. scorpioides* e 5 espécies de tartarugas marinhas (*Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Dermochelys coriácea*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys olivácea*).

A família Kinosternidae abrange 25 espécies distribuídas em quatro gêneros, entre os quais se encontra *Kinosternon* com 18 espécies aproximadamente. A espécie *Kinosternon scorpioides* caracteriza-se por possuir hábito semiaquático e quando adultos pode atingir 15,26 e 11,31 cm de comprimento e largura de carapaça respectivamente, 13,35 e 8,01 cm de comprimento e largura de plastrão e peso de 430,08g. Em machos esses tamanhos podem ser 14,79 e 9,79 cm de comprimento e largura de carapaça respectivamente e 12,3 e 7,46 cm de comprimento e largura de plastrão respectivamente e peso de 314,05. Estes quelônios podem viver em ambientes alagados, mas para se reproduzirem podem alcançar o ambiente terrestre. *K. scorpioides* possui uma ampla variedade reprodutiva no ambiente (CASTRO, 2006, PEREIRA et al., 2007).

K. scorpioides possui uma ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado desde a Costa Rica até o Norte da Argentina e do Brasil. Possui registros de ocorrência no

Pará e no Maranhão podendo ser conhecido popularmente como “muçã” ou “jurará” respectivamente, este último pelos maranhenses (CABRERA & COLANTONIO, 1997; BERRY & IVERSON, 2011).

Devido ao sabor e à qualidade da carne e de seus subprodutos, *K. scorpioides* tem sido explorado constantemente, fazendo parte da história, dos costumes e da economia de comunidades ribeirinhas e urbanas. O aparato legal desta espécie não é levado em consideração e seus estoques naturais têm sido amplamente explorados, sem controle (CASTRO, 2006). No Maranhão, é possível perceber o reflexo dessa superexploração na região da Baixada Maranhense, especialmente na cidade de São Bento onde o mesmo tem sido recurso alimentar constituindo fonte proteica e econômica de muitas famílias (PEREIRA et al., 2007).

Dessa forma, faz-se necessária buscar programar ações de manejo, que necessitam, para seu adequado planejamento, de maiores conhecimentos sobre a reprodução da espécie. Em relação aos aspectos reprodutivos e embrionários de *K. scorpioides*, as informações ainda não são totalmente esclarecidas, não havendo base de sustentação na literatura científica. Sabe-se que as fêmeas da espécie depositam seus ovos em solo argiloso e logo após 150 dias de incubação ocorre eclosão dos filhotes (DELDUQUE, 2000; CASTRO, 2006; MOLINA & LISBOA, 2007; CAVALCANTE et al., 2011). 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).

No que se referem ao desenvolvimento embrionário, várias espécies de répteis já tiveram seus estágios embrionários determinados, como descrevem os estudos realizados com *Chelydra serpentina* por YNTEMA (1968; 1964); seguido por Crastz (1982) para *Lepidochelys olivácea*; Tokita & Kuratani (2001) para *Pelodiscus sinensise*; Greenbaum (2002) para *Trachemys scripta*. Os estágios de desenvolvimento de *K. scorpioides*, no entanto, ainda não estão esclarecidos.

Vários são os autores que relatam que o processo de determinação sexual em espécies de Testudines está relacionado à temperatura do ambiente, entre os quais se destaca Yntema & Mrosovsky (1980) em *Caretta caretta*; Alho et al., (1985) em *Podocnemis expansa* e Malvasio et al., (1999) com *Trachemys dorbignyi*. Em *K. scorpioides*, assim como outras espécies de Testudines, a determinação sexual é inteiramente influenciada pela variação de temperatura (MALVASIO et al., 1999) 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.

Diante do exposto, o trabalho tem por principal objetivo descrever a biologia do desenvolvimento do *K. scorpioides* em diferentes fases, tendo como base a descrição fenotípica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local e coleta dos embriões/fetos

No cativeiro experimental localizado no prédio do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão, 5 baias contendo ninhos marcados foram monitoradas entre os meses de abril a novembro de 2014 sob licença Nº 1899339/2008/IBAMA. O viveiro experimental possui 112 espécimes distribuídos em 81 fêmeas e 31 machos. Um total de 144 ovos foram coletados e depositados em chocadeiras distintas, entre os quais 54 ovos foram utilizados para descrição embrionária, em que 27 foram depositados na chocadeira a 26°C e os outros 27 em chocadeira a 30°C. A diferença de temperatura foi considerada para confirmação, quando possível, em nível macroscópico, o sexo dos indivíduos de acordo com a diferença de temperatura. Para confirmação de que a postura dos ovos era recente, utilizamos as características de coloração e rigidez da casca. A flutuação de temperaturas no interior das chocadeiras obedeceu a uma ordem de $1^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Dos ovos mantidos nas chocadeiras ao longo do processo de incubação, eram retirados três exemplares em intervalos regulares de 1 semana (a cada 7 dias de incubação). Esses procedimentos foram repetidos até a primeira eclosão natural dos ovos. Durante os procedimentos de retirada dos embriões/fetos, os ovos não fecundados, ou seja, não embrionados, foram descartados do experimento. Para o procedimento, inicialmente os ovos eram pesados e medidos em dois momentos, durante a coleta dos ovos no cativeiro experimental e na abertura dos mesmos para coleta das amostras. Os pesos foram retirados a partir de balança digital de precisão 0,1g. Tiveram mensurados o seu comprimento e largura, na região equatorial com paquímetro de precisão 0,01mm. Para obtenção dos embriões/fetos, as cascas dos ovos foram quebradas cuidadosamente com o auxílio de pinça cirúrgica. Em seguida, o embrião/feto foi coletado e depositado em placa de petri juntamente com os envoltórios e o vitelo. Após excluir os anexos, procedia-se com a tomada dos dados biométricos como Comprimento da Carapaça (CC), Largura da Carapaça (LC), Comprimento do Plastrão (CP), Largura do Plastrão (LP), Altura e Comprimento Total divididos em Comprimento Total do Embrião (CTE) e Comprimento Total do Feto (CTF) e peso. Para as análises estatísticas utilizou-se o Programa R Development Core Team (2011). Gráficos foram construídos utilizando o Excell 2010. Os procedimentos realizados seguiram-se

rigorosamente os princípios de bem-estar animal recomendado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão sob Licença CEEA/UEMA n° 034/2010.

2.2. Descrição dos estágios embrionário/fetal

A diferença entre as temperaturas no interior das chocadeiras foi um dos critérios considerados para a descrição dos estágios e identificação do sexo do indivíduo de acordo com a temperatura. Embriões e fetos submetidos a diferentes temperaturas (26°C e 30°C) foram caracterizados de acordo com o peso e comprimento total observados em chocadeiras distintas. Essas medidas foram consideradas para avaliar o grau de diferenciação dos embriões machos e fêmeas durante o desenvolvimento embrionário submetido a diferentes temperaturas de incubação. Os estágios embrionários de *K. scorpoides* foram determinados de acordo com o surgimento de características externas observadas, sendo consideradas somente as fenotípicas dos embriões e planejados de acordo com a metodologia proposta por Yntema (1964). As principais estruturas caracterizadas e utilizadas como parâmetros foram: aparecimento da notocorda, coluna vertebral, aparecimento e desenvolvimento do olho, formação e coloração da carapaça e do plastrão, surgimento e formação de escudos dérmicos na carapaça e escudos femorais e abdominais do plastrão, desenvolvimento dos membros, aparecimento de membranas e de dígitos nas patas, desenvolvimento da mandíbula, das pálpebras, níveis de vitelo do embrião, desenvolvimento da região caudal. Para as observações mais precisas das estruturas, utilizou-se uma lupa (*Flexo lupa, Lumeno, 724x*) e as imagens foram registradas através de uma câmera fotográfica (*Sony, Cyber-Shot, 8.1 Mega pixels*).

3. RESULTADOS

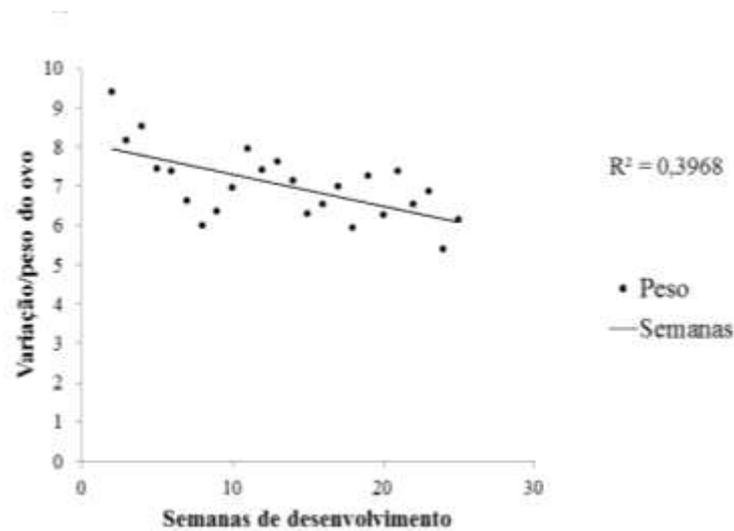
As descrições das fases embrionária e fetal foram feitas dentro do período de desenvolvimento que compreendeu da 1ª a 9ª semana.

Os ovos coletados para este estudo apresentaram um padrão de cor e tamanho variável, onde os mesmos possuíam uma cor rosa e branca e alguns com mancha branca na porção mediana. Percebeu-se ainda, que os mesmos, no momento de coleta, eram mais claros e frágeis e com o avanço dos estágios de desenvolvimento, adquiriram coloração mais escura e casca mais rígida. Os dados biométricos dos ovos estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1: Biometria dos ovos de *K. scorpioides*, obtidos de cativeiro. São Luís-Ma, 2014.

Variável Analisada	Média	Desvio Padrão
Peso do ovo (g)	7,80	7,80 ± 0,72
Comprimento do ovo (cm)	3,48	3,48 ± 0,13
Largura do ovo (cm)	1,89	1,89 ± 0,04

Observou-se, de acordo com análises estatísticas realizadas uma regressão inversa considerando o peso do ovo como variável biológica relacionada à fase de desenvolvimento embrionário/fetal de *K. scorpioides*. Visualmente, o ovo apresentava uma diminuição em seu peso de acordo com o avanço desse período. De acordo com análises de regressão, o coeficiente de determinação foi de $R^2 = 0,3968$, em que se pode observar que os valores dos pesos mostraram-se inversamente proporcionais à taxa de desenvolvimento, ou seja, 39,68% da variação do peso do ovo podem ser explicados pela variação do tempo do desenvolvimento dos mesmos (Figura 1). As variáveis como comprimento e largura dos ovos também foram testadas e analisadas observando que os valores do coeficiente de determinação foram relativamente baixos, correspondendo a $R^2 = 0,189$ e $R^2 = 0,0723$ respectivamente.

**Figura 1:** Correlação entre o peso do ovo e o período de desenvolvimento embrionário/fetal de *K. scorpioides*.

Quanto ao efeito da temperatura sobre o peso dos embriões/fetos, obteve-se uma diferenciação nos valores médios entre a 2ª e 9ª semana de desenvolvimento exposto a diferentes temperaturas (Figura 2).

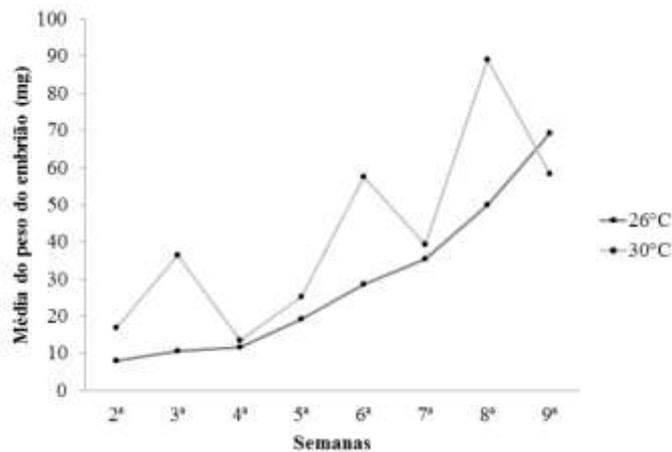


Figura 2: Média do peso (mg) de embriões/fetos *K. scorpioides* avaliados da 2ª a 9ª semana de desenvolvimento mantidos em cativo sob diferentes temperaturas de incubação.

Os estágios embrionário/fetal foram definidos com base no estudo realizado com a espécie *Chelidra serpentina* descrito por Yntema (1968) para o mesmo período. As descrições das amostras estão compreendidas entre os estágios II (1ª semana) e VIII (9ª semana), baseados nas características fenotípicas. A partir da 10ª semana, observou-se o mesmo padrão fenotípico para todos os estágios embrionários, estando, portanto as demais estruturas apenas em crescimento e desenvolvimento. Importante se faz explicar que a partir do Estágio VII (42 dias) consideramos a fase de transição do desenvolvimento embrionário para o fetal, fase essa em que as características morfológicas da espécie são evidentes, entretanto, essas estruturas se tornam progressivamente marcantes em termo de coloração e tamanho a partir do Estágio X (70 dias).

Estágio I (1ª semana)

Na primeira semana de desenvolvimento observou-se bastante vitelo com início de vascularização do embrião. Neste estágio, o saco vitelínico é a primeira membrana extraembrionária a ser formada, originando uma bolsa membranosa que envolve totalmente a massa vitelínica.

Estágio II (2ª semana)

O embrião apresentava-se em fase inicial de seu desenvolvimento, sendo possível observar vasos sanguíneos distribuídos nos tecidos em formação e na membrana vitelínica, contendo uma abundância de vitelo. Nesta fase do desenvolvimento percebe-se como as primeiras estruturas da organogênese, a formação do sistema cardiovascular (Figura 3).



Figura 3: Embrião de *K. scorpioides* com 2 semanas de desenvolvimento. Destaque para a riqueza vascular (seta).

Estágio III (3ª semana)

Nesta fase o embrião começa a adquirir formato característico com o surgimento de estruturas importantes. O processo maxilar começa a aparecer, bem como a cabeça, início de formação da vesícula óptica. É possível já observar o pró-encéfalo. Os brotos dos membros pélvicos e torácicos e o intestino primitivo são evidentes. A coluna vertebral já se torna visível. O eixo orientado no sentido caudoventral é perceptível e a flexão do tronco é maior, oferecendo ao embrião um formato encurvado com a extremidade da cauda mais estreita e retorcido (Figura 4). Nesta fase foi possível obter a biometria. **Peso Médio:** 0,12 mg; **Comprimento Médio:** 0,75 cm.

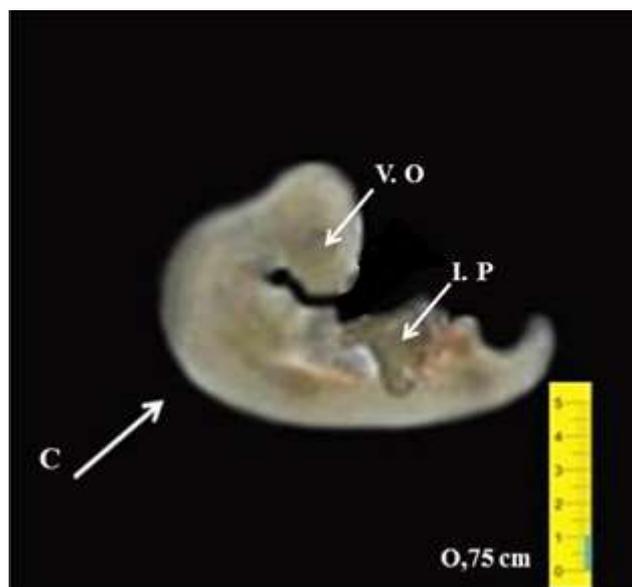


Figura 4: Embrião de *K. scorpioides* com 3 semanas de desenvolvimento. Observar o dobramento do embrião (C); início de formação da vesícula óptica (V. O) e Intestino primitivo (I. P).

Estágio IV (4ª semana)

Placódio já formado com início da pigmentação escura e o processo mandibular bem visível. Os brotos dos membros torácicos e pélvicos exibem maior diferenciação e já é possível observar as vesículas cefálicas (Prosencéfalo, Mesencéfalo e Robencéfalo). A flexão do embrião aumenta consideravelmente e a saliência fronto-nasal direciona-se a um contato com a cauda. A orientação da coluna vertebral é visível formação inicial da carapaça (Figura 5).

Peso Médio: 0,11mg; **Comprimento Médio:** 1,07 cm.



Figura 5: Embrião de *K. scorpioides* com 4 semanas de desenvolvimento. Observar vesículas encefálicas (Prosencéfalo (P); Mesencéfalo (M) e Robencéfalo (R), e Somitos (S).

Estágio V (5ª semana)

Os membros pélvicos e torácicos tornam-se visíveis, quando comparados às modificações ocorridas no estágio anterior. O crescimento dos brotos dos membros e da cauda foi mais acentuado neste estágio. A pigmentação do placódio torna-se mais aparente com destaque para a pupila. A curvatura cervical e fosseta nasal aparentes. A carapaça encontra-se completamente formada e visível, com o início da formação do plastrão e da cauda e esta, alongada, larga na porção final da coluna e afinando-se caudalmente, neste estágio a cauda ainda não se apresenta totalmente retorcida (Figura 6). **Peso Médio:** 0,20 mg; **Comprimento Médio:** 1,87 cm.

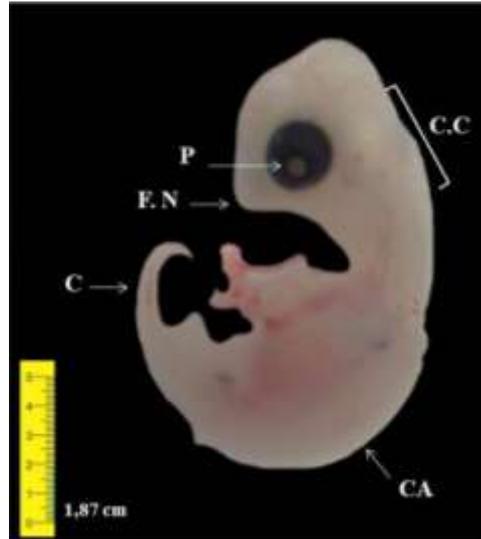


Figura 6: Embrião de *K. scorpioides* com 5 semanas de desenvolvimento. Observar carapaça em formação (seta); Pupila (P); Cauda (C) e Curvatura Cervical (C.C).

Estágio VI (6ª semana)

Cabeça e estruturas pélvicas e torácicas foram observadas, mas ainda sem coloração aparente. A carapaça encontrava-se bem visível, mas ainda sem a coloração escura e sem formação de placas dérmicas e o plastrão encontrava-se em formação. O placódio torna-se proeminente, sendo visíveis as pálpebras. As mandíbulas são aparentes. Os vasos sanguíneos ainda presentes, bem como vitelo. Região caudal encontra-se em formação adquirindo-se um formato retorcido. Já é possível verificar o formato peculiar da tartaruga. Assim, entendemos que esta fase compreende a transição para o período fetal do desenvolvimento do jurará, o que passamos a considerar. **Peso Médio:** 0,39 mg; **Comprimento Médio:** 2,34 cm.

Estágio VII (7ª semana)

O feto, neste período, apresenta os brotos dos membros torácicos e pélvicos bem visíveis, bem como o placódio e a formação dos dígitos com membranas interdigitais. Já é possível observar uma estrutura peculiar da tartaruga, onde a carapaça já é inteiramente observada, com destaque das placas dérmicas. Observa-se na cabeça, a região do placódio com uma elevação aparente. A margem rostral do processo mandibular é perceptível. O plastrão encontra-se formado onde se apresenta aberto centralmente para manter a conexão com o saco vitelínico. Neste estágio foi possível verificar o batimento cardíaco do animal. As estruturas como carapaça e cabeça começam a adquirir coloração escura com os primórdios da formação de escudos dérmicos conferindo uma característica especial e diagnóstica do animal. A região caudal encontra-se inteiramente visível com um aspecto retorcido, similar à cauda de

escorpião, característica esta que confere ao nome da espécie.. (Figura 7). **Peso Médio:** 0,43 mg; **Comprimento Médio:** 3,10 cm.



Figura 7: Feto de *K. scorpioides* com 7 semanas de desenvolvimento. Observar plastrão aberto centralmente (seta).

Estágio VIII (8ª semana)

Membros torácicos e pélvicos formados, desenvolvimento dos sulcos digitais. A região do placódio torna-se proeminente e as pálpebras superiores são visíveis. O processo mandibular é aparente. É possível observar a carapaça totalmente formada, bem como o plastrão. O animal começa a apresentar pigmentação de coloração escura em sua carapaça e completa formação de escudos dérmicos na região dorsal e de escudos femorais e abdominais do plastrão (ventral). O feto apresenta-se em formato ovalado e vitelo em abundância circundado por membrana vitelínica parcialmente vascularizada (Figura 8). **Peso Médio:** 0,58 mg; **Comprimento Médio:** 3,15 cm.



Figura 8: Feto de *K. scorpioides* com 8 semanas de desenvolvimento. Observar plastrão inteiramente formado (seta).

Estágio IX (9ª semana)

Um padrão fenotípico é perceptível, como coloração da carapaça de cor negra, mas ainda não são visualizadas manchas amarelas nas margens. Nesta fase, o plastrão apresenta-se negro no centro. Escudos dérmicos são bem visíveis, bem como a proeminência do placódio, pálpebras aparentes, cauda e membros pélvicos e torácicos completamente formados, nestes percebe-se as membranas interdigitais e os dígitos (Figura 9). **Peso Médio:** 79 mg; **Comprimento Médio:** 3,02 cm.

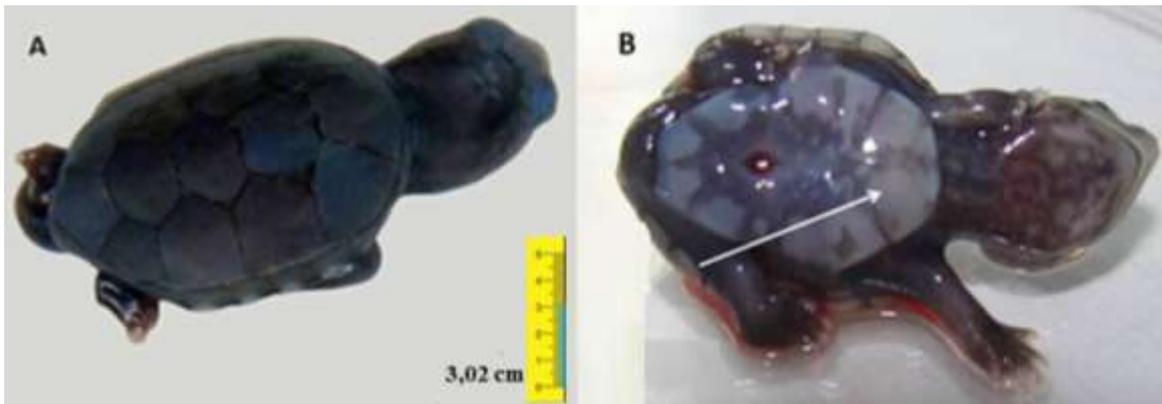


Figura 9: (A) Feto de *K. scorpioides* com 9 semanas de desenvolvimento. (B) Observar plastrão e carapaça com os escudos bem marcados. Nesta fase o feto apresenta o padrão fenotípico (seta) da espécie.

Durante a descrição e caracterização dos estágios embrionários, mudanças evidentes foram observadas, dando destaque para o surgimento de estruturas e modificações importantes para o animal, conferindo, desta forma, peculiaridades da espécie em estudo. Abaixo segue uma visão geral dos estágios descritos referente à 1/3 do desenvolvimento de *K. scorpioides*.

Estágio X ao XXV (10ª a 25ª semana)

A partir da 10ª semana de desenvolvimento, observou-se o mesmo padrão fenotípico para todos os estágios embrionários até à 25ª semana. Aos 175 dias de incubação, os ovos incubados eclodiram confirmando o final do desenvolvimento. Os indivíduos observados já possuíam todas as estruturas externas formadas. A cabeça apresentava um padrão de coloração de cor negra com manchas amarelas. Os olhos e a vesícula óptica mostraram-se proeminentes com pálpebras totalmente formadas, e as pupilas nítidas e bem visíveis. A mandíbula apresentou os movimentos de abertura e fechamento do bico bastante acentuado. O animal apresentava-se em um formato ovalado o saco vitelínico era parcialmente

vascularizado. As placas dérmicas claramente demarcadas nas regiões marginais, nucal, vertebrais e costais da carapaça, bem como peitoral, gular, umeral, femoral e abdominal do plastrão encontravam-se totalmente formados. O padrão fenotípico observado em todos os estágios foi uma carapaça de cor negra e manchas amarelas nas margens e um plastrão negro no centro e amarelo nas extremidades. Todas estas características foram descritas em todos os estágios, a partir da 10^a até a 25^a semana de desenvolvimento (Figura 11 A e B).

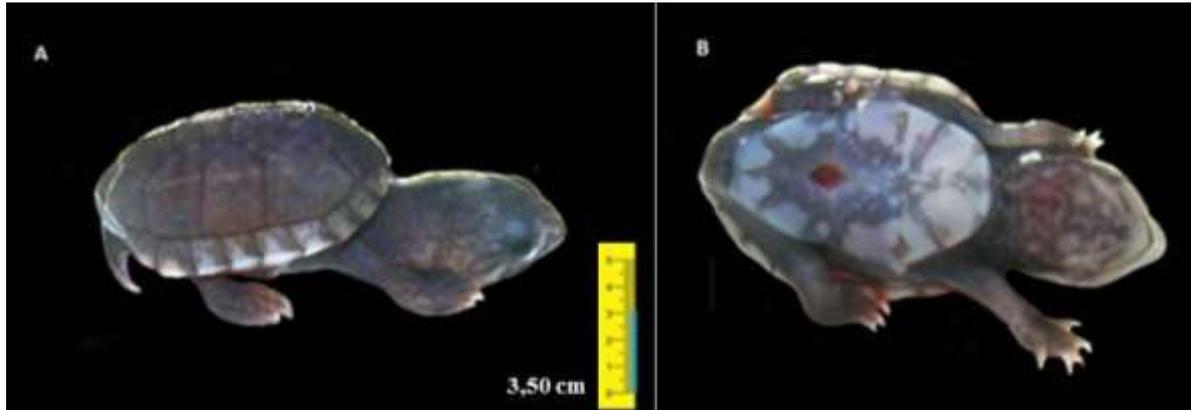


Figura 10: (A) vista dorsal - padrão fenotípico de *K. scorpioides*, em destaque a carapaça; membros e dígitos (B) vista ventral - padrão fenotípico do plastrão, membros e dígitos observados nos estágios X ao XXV.

4. DISCUSSÃO

É possível encontrar trabalhos descritivos sobre a biologia do desenvolvimento em espécies de répteis, sobretudo em quelônios aquáticos. É válido citar os trabalhos de Zhao et al., (2015); Anunciação (2013); Piekarski & Olsson (2011); Roscito (2010); Greenbaum (2002); Tokita & Kuratani (2001); Molina & Gomes (1998); Crastz (1982); Yntema (1980; 1968; 1964). Entretanto, quando se trata da família Kinosternidae, os trabalhos tornam-se escassos especialmente *K. scorpioides*. A abordagem do estudo embrionário de *K. scorpioides* nesta pesquisa constitui-se de um dos primeiros trabalhos existentes até o momento. Neste cenário, as discussões e observações realizadas nesta pesquisa baseiam-se na literatura disponível para os répteis como grupo mais amplo, para aves e mamíferos.

No que se refere ao comprimento, largura e peso dos ovos de *K. scorpioides*, Silva (2011) encontrou para a mesma espécie valores entre 37,2 mm, 20,7 mm e 9,9 g respectivamente. Araújo (2007) 8,6 g; 3,81 cm (comprimento) e 2,33 cm (largura) e Sexton (1960) observou apenas duas variáveis, comprimento (3,7 a 4,0 cm) e largura (1,8 a 2,09 cm). Estes dados são próximos aos encontrados para este trabalho, onde os valores dessas variáveis foram em média de 7,80g (peso); 3,48 cm (comprimento) e 1,89 (largura). A relação entre a perda de peso do ovo e o tempo de desenvolvimento embrionário foi de aproximadamente

39% de significância. Supõe-se que a temperatura e a manipulação experimental e o próprio período de desenvolvimento são fortes fatores que podem está atuando para a perda de peso durante o desenvolvimento embrionário de *K. scorpioides*. Pode-se relacionar estes resultados com os encontrados por Pedroso et al., (2006) em trabalhos feitos com ovos de codorna japonesas, quando estes autores associam esta perda as próprias condições de armazenamento e temperatura dos ovos.

O ciclo de desenvolvimento de *K. scorpioides* se completou na 25ª semana quando os ovos apresentaram expressiva taxa de eclosão, ou seja, 175 dias de incubação. Os resultados encontrados são similares aos de Anunciação (2013) que teve uma taxa de eclosão média de 177 dias para a mesma espécie, em estudo de animais de cativeiro. Em outras espécies é descrito por Yntema (1968), taxa de eclosão com 132 dias (19 semanas) para a espécie *Chelydra serpentina*. Molina & Gomes (1998) observou um período máximo de 120 dias para eclosão de ovos de *Trachemys dorbignyi*. Os dados levantados pelos autores citados são próximos aos encontrados para este estudo, mesmo em espécies e ordem diferentes em termos de tamanhos.

Variações do período de incubação em tartarugas estão relacionadas não só a características de cada espécie como também ao tempo de exposição a cada temperatura, que interfere também no sexo dos indivíduos (ACKEMAN, 1997; BONACH et al., 2011; MOELLER, 2013). Apesar dessa indicação, neste estudo, verificamos que o tempo de eclosão não variou entre as duas chocadeiras utilizadas, ou seja, foi o mesmo para as duas temperaturas de incubação. Os ovos de *K. scorpioides* eclodiram no período de 175 dias quando mantidos a uma temperatura constante de 26 ou 30°C. 120 dias para *Trachemys dorbignyi* incubados a 25 e 31°C (MOLINA & GOMES, 1998), 132 dias para *Chelydra serpentina* incubados a 20 e 30°C (YNTEMA, 1964) e 48 dias de incubação para *Pelodiscus sinensis* incubados a uma temperatura de 30±2°C (TOKITA & KURATANI, 2001).

Ainda quanto a comparação entre as diferentes temperaturas de incubação, os valores médios de peso dos embriões submetidos a diferentes temperaturas (26 e 30°C) foi bastante evidente entre a 2ª e 9ª semana de desenvolvimento. Nota-se que para machos o aumento do peso mostrou-se constante ao longo desse período e que estes são mais leves que as fêmeas. Já para estas a curva de aumento do peso mostrou-se irregular, provavelmente devido a ampla variação dessa característica, não elucidada pelo tamanho amostral utilizado.

O tamanho do embrião sua relação com o período do desenvolvimento embrionário e/ou fetal também foi um fator observado, constatando-se crescimento significativo durante a fase do desenvolvimento embrionário. Yntema (1968) em trabalhos realizados para a espécie

Chelydra serpentina observou o comprimento da carapaça com o diâmetro do ovo e correlacionou-as. Assim, descreve que o tamanho do embrião muda drasticamente durante o seu desenvolvimento.

Descrevemos 25 estágios do desenvolvimento embrionário da tartaruga *Kinosternon scorpioides* utilizando-se de uma caracterização macroscópica com base na morfogênese durante todo o período embrionário e embrionário/fetal.

Os embriões coletados apresentaram-se bastante diferenciados de acordo com o período de incubação. O padrão fenotípico do feto nos estágios finais de desenvolvimento foi bastante evidente, onde os mesmos possuíam carapaça de cor negra contendo manchas amarelas nas margens. O plastrão apresentava-se negro no centro e amarelado nas suas extremidades. A cabeça preta com machas amarelas. Os aspectos desta fase de desenvolvimento são semelhantes aos de outras fases como na adulta, independente do sexo onde são descritos por Anunciação (2013) e Castro (2006).

Quanto aos estágios iniciais de desenvolvimento (Estágio I - 7 dias de incubação) não foi possível nesta pesquisa destacar as estruturas, devido ao pouco desenvolvimento, mas ao analisarmos os conteúdos do ovo, somente eram percebidos os elementos constituintes do ovo como o albúmem e vitelo. No estágio II (14 dias), aparentemente foi visualizado o início do desenvolvimento dos vasos sanguíneos para a vascularização alantóica e ainda uma cavidade amniótica já estabelecida rica em líquido amniótico. Comparando-se ao período de formação dos anexos embrionários em aves, nesta fase já é possível observar as estruturas citadas, com destaque para uma cavidade seroamniótica (GARCIA & FERNÁNDEZ, 2001).

Os somitos foram visualizados no estágio IV (42 dias), mas, no entanto, não foi possível contar os mesmos durante esta fase. É importante destacar que estas estruturas são importantes para a formação da coluna vertebral dos músculos esqueléticos do corpo e na organização segmentar do sistema nervoso periférico de vertebrados, sobretudo em tartarugas. A idade do embrião pode ser expressa pela quantidade de somitos existentes em diferentes fases de desenvolvimento embrionário (SADLER, 2008). Neste trabalho não foi possível determinar a idade dos embriões a partir da contagem dos somitos. No estágio II (14 dias), os somitos não foram visíveis devido o tempo de desenvolvimento. Vesícula ótica aparente e breve curvatura da coluna vertebral são descritas nesta fase. O surgimento destas estruturas neste estágio também é relatado por Tokita & Kuratani (2001) em estudos comparativos realizados com a espécie *P. sinensis*, espécie de tartaruga que habita zonas húmidas e águas salobras.

No que se refere à morfologia macroscópica do embrião com 28 dias (estágio IV) de desenvolvimento, percebe-se que o processo mandibular torna-se bem aparente estendendo-se ventralmente ao embrião. A morfologia da cabeça, da íris e a vesícula óptica já são formadas neste estágio, sendo que para a tartaruga *Chelydra serpentina* pode ocorrer aos 30 dias de desenvolvimento, para *Pelodiscus sinensis*, aos 20 dias e para *Trachemys scripta*, a pigmentação da retina ocorre aos 35 dias de desenvolvimento (YNTEMA, 1964; BEGGS et al., 2000).

Quando se observa a morfologia fenotípica do embrião do estágio V (35 dias), é notável a presença da íris do olho. De forma geral, percebe-se que o embrião começa a possuir estruturas pré-formadas durante o desenvolvimento embrionário, principalmente a carapaça. Há muitos anos atrás, a origem desta estrutura em tartarugas permaneceu obscura, mas achados demonstram que a estrutura espacial da mesma, quando comparado em tartarugas, a relação músculo/esquelético é conservada, não tendo diferenças significativas dentro do grupo (NAGASHIMA et al., 2012).

No estágio VI (42 dias) o embrião de *K. scorpioides* foi caracterizado pelo surgimento evidente das pálpebras, narinas, aumento de massa e pigmentação aos 36 dias de incubação. Estes dados podem ser comparados aos encontrados por Andrews (2004) em estudos com *Chrysemys picta* e *Chelonia mydas* onde estas estruturas apareceram entre 22 e 28 dias respectivamente, chegando próximo aos encontrados para a espécie *K. scorpioides*. O embrião cresce à medida que o tempo de incubação progride, principalmente nos períodos finais de seu desenvolvimento.

A vascularização do embrião de jurará aos 14 dias de incubação foi bastante evidente e intensa. Este arranjo anatômico em mamíferos ocorre por volta da terceira semana de desenvolvimento embrionário (MOORE & PERSAUD, 2008). Nos equinos, após o quarto dia de gestação (SHARP, 2000) e em ratos, por volta de 8 a 10 dias de gestação (WALLS et al., 2008).

Um padrão similar de pigmentação e desenvolvimento foi observado em todos os indivíduos estudados a partir da 10ª semana de desenvolvimento onde se observou no feto, início de pigmentação da carapaça a partir do estágio VII (42 dias). A coloração confere uma característica especial da espécie e a princípio apresenta-se de cor negra e à medida que o período de desenvolvimento se estende, vai adquirindo a coloração negra ao centro da carapaça e amarelo nas partes laterais da mesma, enquanto no plastrão o tom amarelo é ao centro e negro nas laterais. Sobre este aspecto Yntema (1968) relatou o surgimento da pigmentação da carapaça em *C. serpentina* a partir da 11ª semana, diferentemente de *K.*

scorpioides que foi descrito na 7ª semana de desenvolvimento fetal. Ambas as espécies desenvolveram-se em temperaturas de incubação diferentes.

5. CONCLUSÃO

Diante da metodologia aplicada, e das respostas obtidas neste trabalho, é possível considerar sobre a biologia do desenvolvimento da tartaruga semiaquática mantida em condições de cativeiro, que os estágios iniciais até a eclosão do ovo foi de 25 semanas (175 dias), com a descrição fenotípica de 24 estágios. O período de desenvolvimento entre as fases embrionária e fetal ocorreu aos 42 dias (6ª semana). Os elementos morfológicos encontrados se assemelharam aos das demais espécies de tartarugas, com poucas variações no tempo de surgimento de algumas estruturas em detrimento das diferenças das fases do desenvolvimento embrionário e fetal. Não houve diferenciação morfológica quanto as variáveis temperaturas, peso e tamanho do embrião/feto.

6. AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Maranhão e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. À Fundação de Amparo À Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) pelo suporte financeiro da pesquisa através do projeto Rebax – Edital 30/2013 (Morfofisiologia e Biologia de jurará (*Kinosternon scorpioides*): Caracterização fenotípica e genotípica de espécie da fauna silvestre maranhense – Região da Baixada Maranhense). Aos membros do grupo de estudo em Anatomia nos procedimentos de abertura dos ovos e aos autores e co-autores pelo apoio na construção deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, R. A. The nest environment and the embryonic development of sea turtles. **The biology of sea turtles**, 1:83-106, 1997.
- ALHO, C. J. R.; DANNI, T. M. S. & PÁDUA, L. F. M. Temperature-dependent Sex Determination in *Podocnemis expansa* (Testudinata: Pelomedusidae). **Biotropica**, 17 (1): 75-78, 1985.
- ANDREWS, R. M. **Patterns of embryonic development**. See Deeming, p. 75-102, 2004.
- ANUNCIACÃO, 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.
- ARAÚJO, J. C. Muçã (*Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766): aspectos teóricos e desempenho reprodutivo de plantéis selecionados para criação em cativeiro (Resultados preliminares). 2007. 57 p. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Bacharelado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém.
- BEGGS, K.; YOUNG, J.; GEORGES, A.; WEST, P. Ageing the eggs and embryos of the pignosed turtle, *Carettochelys insculpta* (Chelonia: Caretto chelydidae), from northern Australia. **Canadian Journal of Zoology**, 78:373-392, 2000.
- BERRY, J. F. & IVERSON, J. B. *Kinosternon scorpioides* (Linnaeu, 1766) – Scorpion Mud Turtle. **Chelonian Research Foundation**, 5(1):063.1-063.15, 2011.
- BONACH, K.; MALVASIO, A.; MATUSHIMA, E. R.; VERDADE, L. M. Temperature-sex determination in *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae). **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, 101(3):151-155, 2011.
- BUJES, C. S. Biologia e conservação de quelônios no delta do rio Jacuí - RS: aspectos da história natural de espécies em ambientes alterados pelo homem. **Tese** (Doutorado em

Biologia Animal), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Porto Alegre, RS, 2008. 248 p.

BUJES, C. S. Os testudines continentais do Rio Grande do Sul, Brasil: taxonomia, história natural e conservação. **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, 100 (4):413-424, 2010.

CABRERA, M. R. & COLANTONIO, S. E. Taxonomic revision of the South American subspecies of the turtle *Kinosternon scorpioides*. **Journal Herpetology**, 31(4):507-513,1997.

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, 2006. 101 p.

CAVALCANTE, A. M. S.; SILVA, A. S. L.; BARRETO, U. H. A.; GUIMARAES, C. D. O.; PALHA, M. D. C. Influência da temperatura na eclosão dos ovos de muçã (*Kinosternon scorpioides*). **Anais** do 9º Seminário Anual de Iniciação Científica da UFRA, 19 a 21 de outubro de 2011.

CRASTZ, F. Embryological stages of the marine turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz). **Revista de Biologia Tropical**, 30(2):113-120, 1982.

DELDUQUE, M. Ficha do bicho. **Globo rural**. Rio de Janeiro: Globo, n. 176, p. 83-84, 2000.

GARCIA, S. M. L de. & FERNÁNDEZ, C. G. **Embriologia**. 2 ed. – Porto Alegre: Artmed, 2001.

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

GUILLOIN, JEAN-MICHEL; GUÉRY, LORELEI; HULIN, VINCENT; GIRONDOT, MARC. A large phylogeny of turtles (testudines) using molecular data. **Contributions to Zoology**, 81(3):147-158, 2012.

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.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014. **Peixes e invertebrados aquáticos ameaçados**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, nº 245, 18 de dezembro de 2014. Seção 1, p. 126.

MOELLER, K. T. (2013). **Temperature-Dependent Sex Determination in Reptiles**. Embryo Project Encyclopedia. Disponível em: <http://embryo.asu.edu/handle/10776/4214#sthash.i7iyRIKh.dpuf>. Acesso em 04 de março de 2015.

MOLINA, F. B. & GOMES, N. Incubação artificial dos ovos e processos de eclosão em *Trachemys dorbignyi* (DUMÉRIL & BIBRON) (REPTILIA, TESTUDINES, EMYDIDAE). **Revista Brasileira de Zoologia**, 15(1):135-143, 1998.

MOLINA, F. B. & LISBOA, C. S. (2007). **Muçuã**. Zoológico de São Paulo, São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Disponível em: <http://www.zoologico.sp.gov.br/repteis/mucua.htm>. Acesso em 12 de dezembro de 2014.

MOLL, D. & MOLL, E. O. **The ecology, exploitation, and conservation of river turtles**. Oxford University Press, New York, 2004, 393 p.

MOORE, K. & PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Básica**. 8ed. São Paulo: Elsevier, 2008. 462p.

NAGASHIMA, H.; KURAKU, S.; UCHIDA, K.; KAWASHIMA-OHYA, Y.; NARITA, Y.; KURATANI, S. Body plano f turtle: na anatomical, developmental and evolutionary perspective. **Anatomical Science International**, 87(1):1-13, 2012.

PEDROSO, A. A.; CAFÉ, M. B.; LEANDR, N. S. M.; STRINGHINI, J. H.; CHAVES, L. S. Desenvolvimento embrionário e eclodibilidade de ovos de codornas armazenados por

diferentes períodos e incubados em umidades e temperaturas distintas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 35(6):2344-2349, 2006.

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.

PIEKARSKI, N. & OLSSON, L. A somatic contribution to the pectoral girdle in the axolotl revealed by long-term fate mapping. **Evolution & Development**, 13(1):47-57, 2011.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2011). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áustria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em <<http://www.R-project.org>>. Acesso em 12 de dezembro de 2014.

ROSCITO, J. G. Desenvolvimento embrionário e a evolução da fossorialidade nos lagartos da tribo Gymnophthalmini (Squamata, Gymnophthalmidae). 2010. 279 p. **Tese** (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia.

SADLER, T. W. **Langman, Embriologia Médica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 347 p.

SEXTON, O. J. Notas sobre la reproduccion de uma tortuga vnezoelana, la *Kinosternon scorpioides*. **Memória de la sociedade de Ciências Naturales la Salle**, Caracas, 20(57):189-197, 1960.

SHARP, D. C. The early fetal life of the equine conceptus. **Animal Reproduction Science**. 60(61):669-679, 2000.

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

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

WALLS, J. R.; COULTAS, L.; ROSSANT, J.; HENKELMAN, M. Three-dimensional analysis of vascular development in the mouse embryo. **Plos one**, 3(8):2853, 2008.

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 Morphology**, 125:219-252, 1968.

YNTEMA, C. L. Procurement and Use of Turtle Embryos for Experimental Procedures. **The Anatomical Record**, 149:577-583, 1964.

YNTEMA, C. L., MROSOVSKY, N. Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. **Canadian Journal of Zoology**, 60: 1012-1016, 1982.

ZHAO, B.; LI, T.; SHINE, R.; DU, W. G. Turtle embryos move to optimal termal environments within the egg. **Biol Lett**, 9:20130337, 2013.



CAPÍTULO III

Validação de primers heterólogos para o gene PP1 (Protein Phosphatase 1) e de seu uso como gene de referência para estudos de desenvolvimento embrionário na tartaruga semi-aquática

Kinosternon scorpioides (Linnaeus, 1766)

Carlos Alailson Licar Rodrigues¹; Ligia Tchaicka²; Alcina Vieira de Carvalho-Neta¹; Larissa Sarmiento dos Santos³ & Alana Lislea de Sousa¹

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

RESUMO

Este trabalho tem por objetivo validar a utilização de primers heterólogos descritos para *Trachemys scripta*, bem como a expressão do gene PP1 (Protein Phosphatase 1) em *K. scorpioides*, identificando assim um gene de referência para estudos no gênero *Kinosternon*. Para isso, 27 amostras de cDNA e DNA total de *K. scorpioides* foram utilizadas em diferentes estágios embrionários. A amplificação por PCR convencional da PP1 mostrou resultados positivos em todos os indivíduos amostrados, tanto nas reações realizadas a partir dos cDNAs obtidos, quanto nas amostras de DNA total dos indivíduos adultos e a uniformidade da expressão do gene em diferentes fases foi comprovada a partir da análise da concentração de DNA amplificado. Dessa forma, tanto a amplificação cruzada do primer utilizado, quanto a efetividade de PP1 como um gene de referência foram validados em *K. scorpioides*, fornecendo uma ferramenta importante para os estudos de desenvolvimento embrionário e mecanismos genéticos envolvidos na Determinação Sexual Dependente da Temperatura/TSD.

Palavras-chave: TSD; *Kinosternon scorpioides*; PP1.

ABSTRACT

This study aims to validate the use of heterologous primers described for *Trachemys scripta*, as well as the expression of PP1 gene (Protein Phosphatase 1) in *K. scorpioides*, with the aim of identifying a reference gene for studies on gender *Kinosternon*. For this purpose, 27 samples of total DNA and cDNA of *K. scorpioides* were used at different embryonic stages. Amplification of PP1 by standard PCR showed positive results for all individuals sampled in both reactions carried out from the cDNAs or the total DNA sampled of adult individuals, and the uniformity of gene expression has been demonstrated in different phases from analysis of the amplified DNA concentration. Thus, both the cross-amplification primer used as the effectiveness of PP1 as a reference gene in *K. scorpioides* has been validated, providing an important tool for studies of embryonic development and genetic mechanisms involved in TSD.

Keywords: TSD; *Kinosternon scorpioides*; PP1.

1. INTRODUÇÃO

Kinosternon scorpioides é uma tartaruga que habita extensas áreas da região Neotropical, sendo mais abundante na Amazônia. Durante o desenvolvimento embrionário essa espécie passa pela Determinação Sexual Dependente da Temperatura (TSD), na qual um maior período de incubação a 30° C determina o nascimento de fêmeas, e incubação a 26° C determina o nascimento de machos (BERRY & IVERSON, 2011; FERREIRA-JÚNIOR 2009). Sabe-se muito pouco a respeito dos mecanismos envolvidos na TSD, especialmente para *Kinosternon*. O estudo da expressão gênica tem esclarecido diversos processos biológicos em diferentes organismos. O advento da utilização de tecnologias como Análise Serial da Expressão Gênica (SAGE); Microarrays; Hibridização, qPCR e sequenciamento contribuiu para o conhecimento de padrões genéticos relacionados a fisiologia de organismos (JUNIOR et al., 2004; ROSA et al., 2007; TSAI et al., 2010).

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* (KETTLEWELL et al., 2000; MUDOCK & WIBBELS, 2003); 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.

Os estudos de expressão gênica realizados em quelônios, que abordaram os gêneros *Trachemys*, *Chrysemys*, *Pseudemys* tem utilizado o gene da proteína PP1 como referência (RAMSEY & CREWS, 2007; RAMSEY et al., 2007; MARQUEZ et al., 2011; CHOJNOWSKI & BRAUN, 2012; CRUZE et al., 2013). Sua validade em espécies distantes evolutivamente, como as do gênero *Kinosternon*, no entanto, precisam ser testados, especialmente os primers utilizados, uma vez que o desenho de primers específicos para esse táxon é dificultado pela ausência de um genoma de referência. Nesse sentido, é importante destacar que os quelônios são geneticamente divergentes entre si. Kinosternidae possui três grupos evolutivos distintos (*Cryptochelys*, *Sternotherus* e *Kinosternon*), e seus gêneros são

muitos diversos, apresentando distâncias genéticas da ordem de 9-17% (citocromo b) (BERRY & IVERSON, 2011/ IVERSON et al., 2013).

Portanto, este trabalho teve por objetivo, validar a utilização de primers heterólogos descritos para *Trachemys scripta* (RAMSEY et al., 2007), bem como a expressão do gene PP1 (Protein Phosphatase 1) em *K. scorpioides*, identificando assim um gene de referência para estudos no gênero *Kinosternon*.

Para o estudo molecular foram obtidas 27 amostras de embriões/fetos, sendo 24 amostras referente a embriões do primeiro terço (1/3) do desenvolvimento embrionário da espécie, 1 amostra de embrião a 15 semanas de desenvolvimento e 2 amostras de DNA extraídos de indivíduos adultos da espécie. Obteve-se 3 indivíduos de *K. scorpioides* Para cada estágio referente ao primeiro terço de desenvolvimento (2^a a 9^a semana).

Os embriões foram obtidos a partir de ninhos localizados em cinco baias do viveiro experimental para *K. scorpioides* (Licença nº 1899339/2008/IBAMA) durante os meses de abril a novembro de 2014. Os ovos foram coletados a partir da ovispostura de fêmeas, em seguida foram encaminhados ao Laboratório de Anatomia da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) e mantidos em chocadeiras artificiais sob diferentes temperaturas de incubação (26°C e 30°C). Para confirmação de que a postura dos os ovos era recente, utilizamos as características de coloração e rigidez da casca. A primeira semana de desenvolvimento não foi considerada para estudo, pois o embrião apresentava-se sem estruturas específicas ou morfologia peculiar expressa.

Para os procedimentos de extração de RNA a partir dos embriões coletados, os mesmos foram conservados em nitrogênio líquido no Laboratório de Patologia Molecular da UEMA. O RNA total foi extraído de todo o embrião a partir do reagente Trizol® Reagent (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia*) de acordo com as especificações do fabricante. Para a extração, 40-100mg de tecido foi homogeneizado em 1 mL de Trizol. O RNA total, depois de extraído foi armazenado a -80°C.

As amostras de RNA total foram diluídas 50 vezes em água DEPC e as leituras foram realizadas em Picodrop para a determinação das absorbâncias no comprimento de onda de 260 nm e 280 nm. O grau de pureza do RNA total extraído foi determinado a partir da razão $A_{260/280}$ considerando-se adequados os valores compreendidos entre 1.8 a 2.0.

RNA total (1,5 ug) foi retrotranscrito em cDNA utilizando o kit comercial Super Script III First-Strand Synthesis System para RT-PCR (*Invitrogen*), para uma reação de volume final de 20uL. 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™ Enzime 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.

Para a amplificação do gene de interesse (PP1) foram utilizados os seguintes reagentes para cada amostra de DNA complementar (cDNA): 5,0 uL de GoTaq®Colorless Master Mix; 1,5 uL de primer forward; 1,5 uL de primer reverse; 1,5 uL de Mg²⁺; 1,0uL de cDNA. O volume final de 10 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. A temperatura de anelamento dos primers foi padronizada de acordo com as descritas em Ramsey et al., (2007), sendo de 60°C. Os primers utilizados neste estudo constam na Tabela 1.

Tabela 1: Primers utilizados em PCR qualitativa.

Gene	Nome do Primer	Sequência	Referência
PP1	PP1F	CAGCARACCCTGAGAACTTCTTCCTG	Ramsey et al., (2007)
	PP1R	GCGCCTCTTGCACTCATCAT	

Os resultados de amplificação foram verificados através de eletroforese horizontal em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo e visualizado em transluminador ultravioleta. Em seguida, o gel foi fotografado em Transluminador (Trasluminator, L-PIX EX, Locus Biotecnologia) (Figura 1). Os produtos de amplificação foram quantificados em espectrofotômetro Picodrop.

A amplificação por PCR convencional da PP1 mostrou resultados positivos em todos os indivíduos amostrados, tanto nas reações realizadas a partir dos cDNAs obtidos, quanto nas amostras de DNA total dos indivíduos adultos. A Figura 1 mostra o perfil das bandas de amplificação, um fragmento de aproximadamente 100 pb. Para otimização da reação, apenas a concentração de Mg²⁺ foi modificada a partir do trabalho que descreveu os primers.

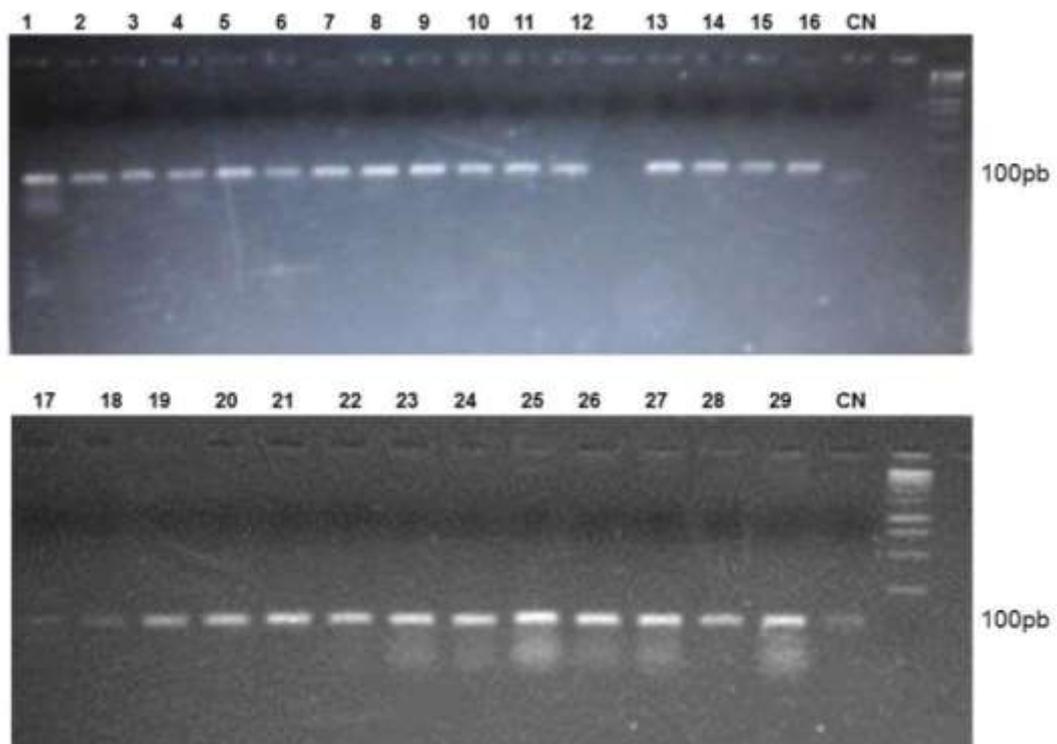


Figura 1: Imagem do gel dos produtos de PCR para a Protein Phosphatase 1 (PP1) em diferentes indivíduos de *K. scorpioides*. Os números correspondem às amostras analisadas no estudo.

A uniformidade da expressão do gene em diferentes fases foi comprovada a partir da análise da concentração de DNA amplificado, que esteve entre 1,8ng e 2,0ng para os estágios embrionários.

A Protein Phosphatase 1 faz parte de um grupo importante de proteínas pertencente à classe das fosfatases de serina/treonina. Estão envolvidas no metabolismo do glicogênio, no processo de contração muscular, atividades neuronais, divisão celular, síntese de proteínas, regulação de receptores de membrana, regulação celular, ciclo circadiano e splicing de RNA (INGEBRITSEN & COHEN, 1983; FONG et al., 2000; CELEUMANS & BOLLEN, 2004; SCHMUTZ et al., 2011) e tem sido usada como gene de referência em organismos diversos, desde humanos até protozoários (KUMAR et al., 2002)

Neste trabalho, tanto a amplificação cruzada do primer utilizado, quanto a efetividade de PP1 como um gene de referência foram validados em *K. scorpioides*, fornecendo uma ferramenta importante para os estudos de desenvolvimento embrionário e e mecanismos genéticos envolvidos na TSD.

2. AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Maranhão e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. À Fundação de Amparo À Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) pelo suporte financeiro da pesquisa através do projeto Rebax – Edital 30/2013 (Morfofisiologia e Biologia de jurará (*Kinosternon scorpioides*): Caracterização fenotípica e genotípica de espécie da fauna silvestre maranhense – Região da Baixada Maranhense). À equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em especial à Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo pela oportunidade de estágio cedida durante o mestrado e aos autores e coautores pelo apoio na construção deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BERRY, J. F. & IVERSON, J. B. *Kinosternon scorpioides* (Linnaeu, 1766) – Scorpion Mud Turtle. **Chelonian Research Foundation**, 5(1):063.1-063.15, 2011.
- CEULEMANS, H. & BOLLEN, M. Functional Diversity of Protein Phosphatase-1, a Cellular Economized and Reset Button. **Physiological Reviews**, 84:1-39, 2004.
- 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.
- CRUZE, L.; HAMLIN, H. J.; KOHNO, S.; MCCOY, M. W.; GUILLETTE-JR, L. J. Evidence of steroid hormone activity in the chorioallantoic membrane of a turtle (*Pseudemys nelsoni*). **General and Comparative Endocrinology**, 186(1):50-57, 2013.
- 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. Aspectos ecológicos da determinação sexual em tartarugas. **Acta Amazonica**, 39(1):139-154, 2009.
- FONG, N. M.; JENSEN, T. C.; SHAH, A. S.; PAREKH, N. N.; SALTIEL, A. R.; BRADY, M. J. Identification of binding sites on protein targeting to glycogen for enzymes of glycogen metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, 275 (45): 35034–9, 2000.
- INGEBRITSEN, T. S. & COHEN, P. The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. **European Journal of Biochemistry**, 132(2):255-261, 1983.
- IVERSON, J. B.; LE, M.; INGRAM, C. Molecular phylogenetics of the mud and musk turtle Family Kinosternidae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 69:929-939, 2013.

JUNIOR, T. C.; BENEDITO, V. A.; FIGUEIRA, A. V. O. Análise Serial da Expressão Gênica (SAGE) na genômica de Plantas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, edição n° 33, 2004.

KUMAR, R.; ADAMS, B.; OLDENBURG, A.; MUSIYENKO, A.; BARIK, S. Characterisation and expression of a PP1 serine/threonine protein phosphatase (PfPP1) from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: demonstration of its essential role using RNA interference. **Malaria Journal**, 1:1-11, 2002.

MARQUEZ, E. C.; TRAYLOR-KNOWLES, N.; NOVILLO-VILLAJOS, A.; CALLARD, I. P. Cloning of estrogen receptor alpha and aromatase cDNAs and gene expression in turtles (*Chrysemys picta* and *Pseudemys scripta*) exposed to different environments. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 154(3):213-225, 2011.

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.

RAMSEY, M.; SHOEMAKER, C., CREWS, D. Gonadal expression of *Sfl* 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.

ROSA, G. J. M.; ROCHA, L. B.; FURLAN, L. R. Estudos de expressão gênica utilizando-se *microarrays*: delineamento, análise e aplicações na pesquisa zootécnica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 36 (suplemento especial), p. 185-209, 2007.

SCHMUTZ, I.; WENDT, S.; SCHNELL, A.; KRAMER, A.; MANSUY, I. M.; ALBRECHT, U. Protein Phosphatase 1 (PP1) Is a Post-Translational Regulator of the Mammalian Circadian Clock. **Plos one**, 6(6):1-12. 2011.

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.

TSAI, H. F.; SAMMONS, L. R.; ZHANG, X.; SUFFIS, S. D.; SU, Q.; MYERS, T.; MARR, K. A.; BENNETT, J. E. Microarray and Molecular Analyses of the Azole Resistance Mechanism in *Candida Glabrata* Oropharyngeal Isolates. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 54(8):3308-3317, 2010.