

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE ÁGUA DOCE E PESCA  
INTERIOR

**DESENVOLVIMENTO ÓSSEO E ESTIMATIVA DE IDADE DO PEIXE-BOI DA  
AMAZÔNIA *Trichechus inunguis* (NATTERER, 1883) POR AVALIAÇÃO  
RADIOGRÁFICA E ULTRASSONOGRÁFICA**

WINNIE MUNIZ BRUM

Manaus, Amazonas

Agosto/2013

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE ÁGUA DOCE E PESCA  
INTERIOR

**DESENVOLVIMENTO ÓSSEO E ESTIMATIVA DE IDADE DO PEIXE-BOI DA  
AMAZÔNIA *Trichechus inunguis* (NATTERER, 1883) POR AVALIAÇÃO  
RADIOGRÁFICA E ULTRASSONOGRÁFICA**

WINNIE MUNIZ BRUM

Orientadora: PhD. Vera Maria Ferreira da Silva

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação do  
INPA, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de mestre em  
Ciências Biológicas, área de  
concentração em Biologia de Água  
Doce e Pesca Interior.

Manaus, Amazonas

Agosto/2013

---

Fontes financiadoras: CNPq, AMPA e PETROBRAS AMBIENTAL

# RELAÇÃO DA BANCA JULGADORA

## Membros

Dr. Fernando César Weber Rosas

Examinador interno

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / INPA

Dr. Rodrigo de Souza Amaral

Examinador interno

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / INPA

Dra. Helena Kiyomi Hokamura

Examinador externo

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro / UENF

Manaus, Agosto de 2013

B893 Brum, Winnie Muniz  
Desenvolvimento ósseo e estimativa de idade do peixe-boi da Amazônia *Trichechus inunguis* (Natterer, 1883) por avaliação radiográfica e ultrassonográfica / Winnie Muniz Brum. --- Manaus : [s.n], 2013.  
105 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2013.  
Orientador : Vera Maria Ferreira da Silva  
Área de concentração : Biologia de Água Doce

1. Sirênios. 2. Peixe-boi. 3. *Trichechus inunguis*. I. Título.

CDD 599.55

**Sinopse:**

Estudou-se o desenvolvimento ósseo das nadadeiras peitorais do peixe-boi da Amazônia em cativeiro nos municípios de Manaus e Presidente Figueiredo, Amazonas. Métodos radiológicos e ultrassonográficos foram adaptados para estimar a idade nesses animais, a anatomia da região e o padrão de evolução das epífises ósseas foram descritos

**Palavras-chave:** Diagnóstico por imagem, desenvolvimento carpal, sirênios, ossificação endocondral.

## **Agradecimentos**

*Aos meus pais, Bill e Lú, pelo apoio e amor incondicionais. E por estarem presentes a cada passo dessa jornada, apesar da distância física.*

*As belíssimas, Sannie e Lírie, que representam perfeitamente a palavra “irmão”.*

*A todo o restante da minha família, tios, avós e primos. Além de sermos familiares, somos companheiros, e divido com vocês mais essa conquista.*

*Aos meus amigos espalhados por esse Brasil imenso. Obrigada pela torcida e pensamentos positivos. Até nosso próximo reencontro.*

*Aos professores do BADPI, cuja dedicação, competência e amor pelo trabalho inspiram. Vocês me ensinaram muito mais do que meros assuntos acadêmicos.*

*À minha orientadora, Vera, por me guiar a cada etapa do projeto e proporcionar a oportunidade única de trabalhar com esses animais maravilhosos. Obrigada por tudo que me ensinou.*

*Às pessoas maravilhosas do INPA que encontrei pelo caminho, em especial à Carminha, Anselmo e todos os tratadores do PREVET, cuja alegria e a gentileza com as quais trabalham é contagiante. Sem a ajuda de vocês esse trabalho não seria o mesmo.*

*Aos amigos, Diogo, Bel, Gália, Gi, Rodrigo, Louzinha, Evelyn, Jone, Lili e todos os demais atuais e ex-membros do LMA.*

*À equipe do CPPMA, especialmente Stella e Daniela.*

*À turma BADPI 2011, Madoka, Rayla, César, Diego, Douglas, Renata, Camila, Bruna, Antonio, Jannise, Sewbert, Andressa, Carol, Fernando, Thiago e Walter. Vocês tornaram a vida manaura mais divertida e o mestrado menos estressante.*

*Ao Alberto, pela companhia, sorrisos, conversas e colo sempre que precisei.*

*Aos amigos que dedicaram parte do seu tempo e suor para ajudar na execução desse trabalho, sem pedir nada em troca. Daniel, Thiago, Walter e Israel, obrigada.*

*“Quando você achar um bicho gordinho  
Comendo capim  
No fundo do rio,  
Diga oi!  
Oi, peixe-boi.*

*Quando você encontrar um bicho gordinho  
Nadando tranquilo  
No fundo do rio,  
Diga oi!  
Oi, peixe-boi.”*

Música infantil – O peixe-boi. Paulo Bira

## Resumo

O peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) é uma espécie, endêmica dos rios da Amazônia e listada como vulnerável no Brasil. Estudos focando aspectos da biologia da espécie, como parâmetros acerca da idade cronológica dos indivíduos, constituem ferramentas importantes para a compreensão da história de vida desses animais. O objetivo do trabalho foi descrever como a ossificação está ocorrendo na espécie e estimar a idade dos indivíduos vivos por meio de métodos de diagnóstico por imagem. Ao longo dos anos de 2011 a 2012, radiografias e exames ultrassonográficos das nadadeiras peitorais de 72 animais (37 machos e 35 fêmeas) mantidos cativos em dois centros de pesquisa e reabilitação no estado do Amazonas, Brasil, foram avaliados para o acompanhamento do desenvolvimento ósseo. Observou-se que a espécie se desenvolve lentamente, sem grandes eventos marcantes, e que não existe dimorfismo sexual no modo como a ossificação acontece, e sim no tempo em que a mesma está ocorrendo. Os métodos radiográficos estimam corretamente a idade. Contudo, as janelas de idade estimada obtidas como resultado apresentam intervalos de tempo muito amplos. As tentativas efetuadas para adaptação de metodologia ultrassonográfica não gerou resultados positivos. Estudos longitudinais futuros de longa duração podem ser realizados na tentativa de aumentar a precisão das estimativas encontradas, com a consequente redução das janelas cronológicas propostas.

Palavras-chave: Sirênios, desenvolvimento carpal, ossificação endocondral, diagnóstico por imagem.

## Abstract

The Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*) is an endemic species of the rivers of the Amazon and listed as vulnerable on Brazil. Studies focusing on aspects of the biology of the species, such as parameters on the chronological age of individuals, are important tools for understanding the life history of these animals. The aim of this study was to describe how ossification occurs in this species and to estimate the age of living individuals using diagnostic imaging methods. Over the years 2011-2012, radiographs and ultrasound exams of the pectoral fins of 72 animals (37 males and 35 females) kept in two research and rehabilitation centers in the state of Amazonas - Brazil, were evaluated for monitoring bone development. It was observed that the species develops slowly without major events, and there is no the sexual dimorphism in the way ossification occurs, although it occurs at different times for each sex. Radiographic methods correctly estimate the age. However, the intervals of estimated age obtained were too wide. The ultrasound method was flawed. Future longitudinal studies of long duration can be performed to increase the accuracy of the estimates obtained, with smaller chronological windows proposals.

Key-words: Sirenia, carpal development, endochondral ossification, Imagiology.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>6</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>10</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
<b>3. MÉTODOS GERAIS .....</b>	<b>11</b>
3.1 ANIMAIS UTILIZADOS.....	11
3.2 ANATOMIA DA NADADEIRA PEITORAL.....	15
3.3 TÉCNICAS RADIOGRÁFICAS.....	17
3.4 SELEÇÃO GERAL DE IMAGENS PARA AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA .....	18
3.5. ANÁLISE GERAL DOS DADOS .....	19
3.5.1. <i>Objetivo específico I</i> .....	19
3.5.2. <i>Objetivo específico II</i> .....	19
3.5.3. <i>Objetivo específico III</i> .....	20
3.5.4. <i>Objetivo específico IV</i> .....	20
3.5.5. <i>Objetivo específico V</i> .....	20
<b>CAPÍTULO I – DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DAS NADADEIRAS PEITORAIS DO PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA AVALIADO POR MÉTODOS RADIOGRÁFICOS .....</b>	<b>21</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>22</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2. MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
2.1 CRESCIMENTO CORPORAL TOTAL X CRESCIMENTO DAS NADADEIRAS .....	25
2.2 SIMETRIA BILATERAL .....	26
2.3 SEQUÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO ÓSSEO.....	27
2.4 TEMPO DE EVOLUÇÃO DOS CENTROS DE OSSIFICAÇÃO .....	28
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
3.1 CRESCIMENTO DA NADADEIRA PEITORAL DE T. INUNGUIS.....	29
3.2 SIMETRIA BILATERAL .....	31
3.3 DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DAS NADADEIRAS PEITORAIS EM MACHOS E FÊMEAS .....	31
3.3.1 <i>Rádio e Ulna</i> .....	32
3.3.2 <i>Carpos</i> .....	34
3.3.3 <i>Metacarpos</i> .....	36
3.3.4 <i>Falanges</i> .....	37
3.4 TEMPO DE APARECIMENTO DOS CENTROS DE OSSIFICAÇÃO.....	38
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>
<b>CAPÍTULO II – USO DE MÉTODOS RADIOGRÁFICOS E ULTRASSONOGRÁFICOS PARA ESTIMATIVAS DE IDADE EM PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA.....</b>	<b>53</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>54</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>55</b>



<b>2. MÉTODOS</b> .....	<b>57</b>
2.1 TÉCNICAS RADIOGRÁFICAS.....	57
2.1.1 Método Greulich e Pyle visual (GP).....	57
2.1.2 Método Tanner e Whitehouse (TW).....	59
2.1.3 Método Eklöf e Ringertz (ER).....	59
2.2 TÉCNICAS ULTRASSONOGRÁFICAS.....	61
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>61</b>
3.1 ÍNDICE DE MATURAÇÃO ÓSSEA (IM).....	61
3.1.1 Índice radial - IR (Fig. 12).....	62
3.1.2 Índice ulnar - IU (Fig. 13).....	63
3.1.3 Índice carpal - IC (Fig. 14).....	64
3.1.4 Índice metacarpal - IMC (Fig. 15).....	65
3.1.5 Índice falangeal – IFP e IFM (Fig. 16).....	66
3.2 RESULTADOS DOS MÉTODOS RADIOGRÁFICOS.....	67
3.2.1 Resultados do Método Greulich e Pyle visual (GP).....	67
3.2.2 Resultados do Método Tanner e Whitehouse (TW).....	68
3.2.3 Padrões métricos dos ossos usando o Método Eklöf e Ringertz (ER) modificado.....	69
3.3 RESULTADOS DO MÉTODO ULTRASSONOGRÁFICO.....	72
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>75</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>82</b>
<b>4. SÍNTESE DO TRABALHO</b> .....	<b>87</b>
4.1. EM RELAÇÃO AO OBJETIVO ESPECÍFICO I.....	87
4.2. EM RELAÇÃO AO OBJETIVO ESPECÍFICO II.....	88
4.3. EM RELAÇÃO AO OBJETIVO ESPECÍFICO III.....	88
4.4. EM RELAÇÃO AO OBJETIVO ESPECÍFICO IV.....	89
4.5. EM RELAÇÃO AO OBJETIVO ESPECÍFICO V.....	89
<b>5. APOIO LOGÍSTICO</b> .....	<b>90</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA GERAL</b> .....	<b>90</b>
<b>ANEXO I. GRÁFICOS DE REGRESSÃO LOGÍSTICA EM OSSOS CARPAIS DE PEIXES-BOIS DA AMAZÔNIA FÊMEAS</b> .....	<b>99</b>
<b>ANEXO II. GRÁFICOS DE REGRESSÃO LOGÍSTICA EM OSSOS CARPAIS DE PEIXES-BOIS DA AMAZÔNIA MACHOS</b> .....	<b>100</b>
<b>ANEXO III – ATLAS DE DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DO PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA FÊMEA.</b>	<b>101</b>
<b>ANEXO IV – ATLAS DE DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DO PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA MACHO.</b>	<b>103</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ASPECTOS EXTERNOS DA ANATOMIA DA NADADEIRA PEITORAL DO PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA. FONTE: ARQUIVO LMA.....	15
FIGURA 2. ANATOMIA ÓSSEA DA MÃO E PUNHO DE <i>T. INUNGUIS</i> IDENTIFICANDO OS OSSOS. ....	16
FIGURA 3. REGRESSÃO LINEAR ENTRE O COMPRIMENTO LINEAR CORPORAL TOTAL (TLCL) E O COMPRIMENTO DA NADADEIRA PEITORAL PARA MACHOS (A) E FÊMEAS (B). ....	30
FIGURA 4. ESQUEMA SIMPLIFICADO DO DESENVOLVIMENTO ÓSSEO EM <i>T. INUNGUIS</i> . A: INDIVÍDUO IMATURO FÍSICAMENTE (FILHOTE COM MENOS DE SEIS MESES DE IDADE). B, C, D, E, F: SEQUÊNCIA DE MATURAÇÃO ÓSSEA (INDIVÍDUOS IMATUROS FÍSICAMENTE: FILHOTES, JOVENS E ADULTOS). G: INDIVÍDUO MATURO FÍSICAMENTE (ADULTO COM MAIS DE 18 ANOS). O NÚMERO DE CENTROS DE OSSIFICAÇÃO AUMENTA COM A IDADE. OS OSSOS DO CARPO APARECEM A PARTIR DE B, TODAS AS EPÍFISES FUSIONAM (G) E ALGUNS INDIVÍDUOS DESENVOLVEM UMA QUINTA FALANGE DISTAL (F E G). ....	32
FIGURA 5. RADIOGRAFIA DE INDIVÍDUO MACHO DE PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA, DE IDADE NÃO CONHECIDA, DEMONSTRANDO A FUSÃO DISTAL DO RÁDIO E ULNA (SETA BRANCA) .....	33
FIGURA 6. RADIOGRAFIA DA NADADEIRA PEITORAL DE PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA FÊMEA DEMONSTRANDO AS ARTICULAÇÕES INTERCARPAIS (SETA BRANCA) E O FUSIONAMENTO PROXIMAL DO RÁDIO E ULNA (SETA VERMELHA) ANTERIORMENTE AO FUSIONAMENTO DISTAL.....	35
FIGURA 7. IMAGEM DE RADIOGRAFIA EVIDENCIANDO O FORMATO TÍPICO TRIANGULAR DAS FALANGES DISTAIS I, II E III (A) E TRAPEZÓIDE DA FALANGE DISTAL V (ZOOM DIGITAL DE 2X) (B).....	37
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO DOS 31 CENTROS DE OSSIFICAÇÃO OBSERVADOS NA NADADEIRA PEITORAL DE <i>T. INUNGUIS</i> , NUMERADOS DE MANEIRA ALEATÓRIA. ....	58
FIGURA 9. CENTROS DE OSSIFICAÇÃO UTILIZADOS PELO MÉTODO DE EKLÖF & RINGERTZ. 2 E 4- COMPRIMENTO DOS OSSOS DO CARPO, 3 E 5- LARGURA DOS OSSOS DO CARPO, 6, 7 E 8- COMPRIMENTO DOS METACARPOS, 9 E 10- COMPRIMENTO DAS FALANGES. 60	
FIGURA 10. ÍNDICE RADIAL. ILUSTRAÇÃO DOS ESTÁGIOS 0 A 2. ....	63
FIGURA 11. ÍNDICE ULNAR. ILUSTRAÇÃO DOS ESTÁGIOS 0 A 2. ....	64
FIGURA 12. ÍNDICE CARPAL. ILUSTRAÇÃO DOS ESTÁGIOS 0 A 1. ....	64
FIGURA 13. ÍNDICE METACARPAL. ILUSTRAÇÃO DOS ESTÁGIOS 0 A 3.....	65
FIGURA 14. ÍNDICE FALANGEAL. ILUSTRAÇÃO DOS ESTÁGIOS 0 A 3 .....	66
FIGURA 15. RADIOGRAFIAS DIGITAIS DAS NADADEIRAS PEITORAIS DE DOIS PEIXES-BOIS DA AMAZÔNIA MACHOS COM ÍNDICE DE MATURAÇÃO ÓSSEA CALCULADO SEGUNDO FÓRMULA: $IM = IR+IU+IC+IMC+IFP+IFD$ . ANIMAL A COM NOVE ANOS DE CATIVEIRO E O ANIMAL B COM UM MÊS DE CATIVEIRO. ....	67
FIGURA 16. <i>BOX-PLOT</i> DAS MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DO ÍNDICE DE MATURAÇÃO ÓSSEA (IM) PARA MACHOS E FÊMEAS DE <i>TRICHECHUS INUNGUIS</i> POR IDADE CRONOLÓGICA, EM ANOS. ....	68
FIGURA 17. IMAGEM DE ULTRASSOM, EVIDENCIANDO A REVERBERAÇÃO ENCONTRADA. VISTA SAGITAL DE METACARPOS EM UM FILHOTE DE PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA. ....	73
FIGURA 18. MEDIDA DA LARGURA (LINHA TRACEJADA) DE UM METACARPO EM UM FILHOTE DE PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA. IMAGEM DE ULTRASSOM. ....	74
FIGURA 19. IMAGEM DE ULTRASSOM DA NADADEIRA PEITORAL DE UM FILHOTE DE PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA COM REGIÃO HIPERECÓICA (SETA), DIFICULTANDO A PRECISÃO DAS ESTRUTURAS. ....	75

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO LONGITUDINAL (GRUPO I) E TOTAL DE RADIOGRAFIAS ANALISADAS .....	12
TABELA 2: NÚMERO DE ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO SECCIONAL (GRUPO II) E TOTAL DE RADIOGRAFIAS ANALISADAS.....	12
TABELA 3: NÚMERO DE ANIMAIS UTILIZADOS SEM HISTÓRICO (GRUPO III).....	13
TABELA 4: FILHOTES ÓRFÃOS DE PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA UTILIZADOS NO ESTUDO E SUAS MEDIDAS CORPORAIS (TLCL) NO MOMENTO DE ENTRADA NOS TANQUES DO LMA OU CPPMA. ....	14
TABELA 5: ANIMAIS COM RADIOGRAFIAS DE AMBAS AS NADADEIRAS PEITORAIS .....	26

TABELA 6. RESULTADOS DAS REGRESSÕES LINEARES DE COMPRIMENTO CORPORAL TOTAL (TSL)/COMPRIMENTO DA NADADEIRA PEITORAL (CNAD) PARA MACHOS E FÊMEAS DE PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA E DA COMPARAÇÃO ENTRE AS REGRESSÕES DE AMBOS OS SEXOS.....	29
TABELA 7. RESULTADOS DO TESTE-T PARA AMBAS AS NADADEIRAS PEITORAIS EM MACHOS E FÊMEAS DE PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA. ..	31
TABELA 8. TEMPO DE APARECIMENTO DAS ESTRUTURAS ÓSSEAS EM FÊMEAS DE PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA. ....	38
TABELA 9. TEMPO DE APARECIMENTO DAS ESTRUTURAS ÓSSEAS EM MACHOS DE PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA. ....	39
TABELA 10. RESULTADOS DO ÍNDICE DE MATURAÇÃO ÓSSEA (IM) USANDO O MÉTODO TANNER E WHITEHOUSE (TW) MODIFICADO PARA PEIXES-BOIS DA AMAZÔNIA, MACHOS E FÊMEAS POR CLASSE ETÁRIA, EM ANOS.....	69
TABELA 11. VALORES DE CORRELAÇÃO CANÔNICA ENCONTRADOS ENTRE AS MEDIDAS ÓSSEAS E O TEMPO DE CATIVEIRO, EM ANOS, PARA O PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA. ....	70
TABELA 12. DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS DE COMPRIMENTO ÓSSEO (CM) MEDIDOS EM MACHOS DE PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA .....	71
TABELA 13. DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS DE COMPRIMENTO ÓSSEO (CM) MEDIDOS EM FÊMEAS DE PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA. ....	72

## 1. Introdução Geral

A determinação da idade cronológica é um parâmetro fundamental no estudo da biologia das espécies. Ele provê a base necessária para quantificar o potencial reprodutivo de uma população, estimar as taxas de crescimento individual (desde o nascimento até a maturidade) e construir planilhas de nascimento e taxa de sobrevivência, fatores necessários à modelagem da população (Danil et al., 2004). Assim, é essencial que o método utilizado para estimar a idade cronológica valorize a acurácia para alcançar a melhor estimativa de idade dos indivíduos.

O Laboratório de Mamíferos Aquáticos (LMA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) realiza há 39 anos importantes estudos sobre a biologia, ecologia e manejo do peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*). O LMA possui um centro de resgate e reabilitação de peixes-bois, que se destina a pesquisas da espécie em cativeiro e à recuperação dos animais.

Em 1974, o pesquisador Robin Best iniciou as pesquisas sobre correlação da idade óssea e idade cronológica do peixe-boi da Amazônia avaliando radiografias das nadadeiras peitorais. O presente estudo pretende dar continuidade a esta linha de pesquisa.

*Trichechus inunguis* é endêmico da bacia Amazônica e registrado no Brasil, Colômbia, Peru e Equador (Husar, 1977). Trata-se do único sirênio exclusivo de águas continentais, habitando rios de águas calmas e lagos (Husar, 1977; Domning, 1982; Rosas, 1994). Não possui unhas nas nadadeiras peitorais e a cor da pele varia entre o cinza escuro e o preto, comumente com a presença de manchas brancas na região ventral (Husar, 1977; Rosas, 1994).

Os peixes-bois possuem baixa taxa de reprodução, produzindo normalmente somente um filhote por gestação e atingem a maturidade sexual após os seis anos de idade (Rosas & Pimentel, 2001; Rodrigues, 2002). A gestação em *T. inunguis* dura cerca de onze meses (Nascimento et al., 2002) e os filhotes são amamentados

por cerca de dois anos (da Silva et al., 2000). O intervalo entre nascimentos ainda não foi determinado, mas estima-se um período de pelo menos três anos (Rodrigues et al., 2008).

Entre os membros da Ordem Sirenia, *T. inunguis* é a menor espécie, alcançando 275 cm de comprimento e 420kg de peso (Amaral et al., 2010). São herbívoros não ruminantes, alimentando-se de macrófitas aquáticas em abundância, com um consumo diário de cerca de 8% do peso corporal (Best, 1981). Guterres-Pazin (2010) identificou 49 espécies vegetais na alimentação da espécie tanto nos períodos de cheia quanto de seca e em ambientes de várzea e igapó.

Explorado comercialmente desde 1542 (Best, 1984) o peixe-boi da Amazônia continua sendo alvo de caça, apesar de protegido por lei na maioria dos países de sua ocorrência, com o predomínio da caça de subsistência nos dias atuais (Marsh et al., 1986; Junk & da Silva, 1997; Rosas, 1994). Domning (1982) relata que entre os anos de 1935-1954 cerca de 8000 a 14000 peixes-bois foram mortos no Amazonas, e no mesmo período foram exportados para a região centro-sul aproximadamente duzentos mil couros de peixe-boi. Atualmente, a caça ilegal e a destruição de habitat são as maiores ameaças a essa espécie endêmica (Rosas, 1994). Particularmente a caça excessiva tem sido um motivo recorrente de ameaça aos sirênios: a vaca-marinha-de-Steller (*Hydrodamalis gigas*), que habitava o Mar de Bering, acabou extinta devido a essa atividade (Best, 1981).

Atualmente embora protegidos por lei, os peixes-bois amazônicos ainda são caçados para consumo, e sua carne pode ser encontrada sendo comercializada ilegalmente na região amazônica (Rosas & Pimentel, 2001). Esta espécie está classificada como “vulnerável” na Lista vermelha da IUCN (International Union for Conservation of Nature) (IUCN, 2010) e no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (da Silva et al., 2008).

Estudos acerca do desenvolvimento ósseo em mamíferos podem ser realizados por meio de estudos radiográficos focados em diversas regiões do corpo: tornozelo, bacia, vértebras cervicais, costelas, mão e punho. Entre estas, a avaliação do índice carpal é mais utilizada em medicina humana, em virtude do baixo custo operacional e tempo de exposição reduzido à radiação (Calles &

Carinhena, 2004). A avaliação carpal visa à análise dos centros de ossificação presentes na região do punho e mão, mais especificamente no carpo, metacarpo e falanges. Para tal, torna-se importante o conhecimento da anatomia dessa área (Santos Pinto, 2007).

A presença de vários ossos e epífises na radiografia de mão e punho, aliado a fácil obtenção e observação dessas estruturas, constituem-se em vantagens sobre outros índices focados nas regiões mencionadas anteriormente. Pelo exame de até trinta centros de ossificação da mão e punho é possível verificar a sequência cronológica de aparecimento e formação dos ossos, assim como a fusão das epífises com as diáfises (Greulich & Pyle, 1959).

Existem vários métodos para avaliação da idade óssea, sendo que entre os mais difundidos e utilizados destacam-se: Greulich e Pyle (GP); Tanner e Whitehouse (TW) e Eklof e Ringertz (ER). Os métodos GP e TW são puramente inspeccionais e qualitativos, enquanto o método ER é quantitativo, baseando-se no comprimento e/ou largura de dez centros de ossificação presentes no carpo, metacarpos e falanges (Carvalho, 1993; Haiter Neto et al., 2000; Gilsanz & Ratib, 2005; Olivete Junior & Rodrigues, 2009).

A idade óssea tem sido considerada um referencial na determinação da idade cronológica, justificando a sua utilização neste estudo, pois o tecido ósseo diferencia-se, desenvolve-se e amadurece de modo pré-determinado, a partir de um centro de ossificação primário, culminando em um osso inteiramente desenvolvido (Karaplis, 2008). Considera-se que o desenvolvimento ósseo da região da mão e punho processa-se paralelamente ao das demais regiões do corpo humano (Haiter Neto et al., 2000). Estudos demonstrando essa relação em pequenos cetáceos também foram realizados (Gluglielmini et al., 2002), sendo conveniente a sua escolha, devido à facilidade de obtenção radiográfica e observação de suas imagens (Haiter Neto et al., 2000).

Segundo Greulich e Pyle (1959), o esqueleto reflete o estado funcional e de desenvolvimento do organismo e provê uma medida mais útil do nível de maturação geral do indivíduo, podendo ser empregado para este propósito, do período do nascimento até o completo desenvolvimento físico. Os centros de ossificação podem

ser analisados, tanto por métodos quantitativos, identificando-se quantos centros de ossificação estão presentes, quanto qualitativos observando-se as alterações na forma e no tamanho dos ossos (Sannomiya & Calles, 2005).

Segundo o conceito de homologia, os membros torácicos de todos os mamíferos possuem estruturas semelhantes, apesar de apresentarem diversas modificações necessárias à adaptação para as diferentes funções exercidas (Hickman et al., 2001). Dessa forma, os esqueletos das nadadeiras peitorais dos sirênios e cetáceos são similares aos esqueletos das mãos de humanos, possuindo a mesma origem embrionária (Pought, 2008), e podendo então ser utilizados para estimar a idade cronológica dos indivíduos de forma análoga aos métodos aplicados à espécie humana.

Estudos acerca da estimativa de idade cronológica em Trichechidae têm sido realizados baseando-se na contagem das camadas de deposição óssea presentes no domo do ouvido interno (Marmontel et al., 1996; Albuquerque Júnior, 2003; Vergara-Parente, 2009) e costelas (Maciel & da Silva, 2009). Esse método, apesar de amplamente aceito e bastante preciso (Hohn, 2008), possui o inconveniente de utilizar apenas exemplares mortos. No entanto, técnicas radiográficas e ultrassonográficas podem ser empregadas em indivíduos vivos, pois além de serem não-invasivas, são de baixo custo e com resultados rápidos (Sannomiya et al., 1998; Sannomiya & Calles, 2005).

Filhotes órfãos de peixes-bois da Amazônia criados em cativeiro apresentam índices de crescimento individuais e singulares, dificultando a estimativa de idade de peixes-bois selvagens com base no comprimento corpóreo. Dados sobre a biologia da espécie são ferramentas importantes no monitoramento de processos relacionados à sua reabilitação e conservação.

Esta dissertação está organizada na forma de dois capítulos intitulados: Desenvolvimento ósseo das nadadeiras peitorais do peixe-boi da Amazônia por métodos radiográficos (Capítulo I) e Uso de métodos radiográficos e ultrassonográficos para estimativas de idade em peixe-boi da Amazônia (Capítulo II). O primeiro se ocupa em descrever os eventos ósseos transcorridos desde o nascimento até a completa maturidade óssea, enquanto o segundo utiliza esses

eventos para elaborar possíveis métodos de estimativa de idade, adaptando metodologias utilizadas em humanos e em outras espécies animais para o peixe-boi da Amazônia.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Avaliar o desenvolvimento ósseo das nadadeiras peitorais em peixe-boi da Amazônia e sua possível utilização na estimativa de idade de indivíduos vivos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- I. Construir um atlas de desenvolvimento ósseo das nadadeiras peitorais para a espécie.
- II. Verificar a presença de variações sexuais no desenvolvimento ósseo das nadadeiras peitorais em indivíduos de peixe-boi da Amazônia.
- III. Verificar o padrão de desenvolvimento ósseo e estimar a idade por meio de avaliação radiográfica das nadadeiras peitorais em indivíduos de peixe-boi da Amazônia.
- IV. Verificar o padrão de desenvolvimento ósseo e estimar a idade por meio de avaliação ultrassonográfica das nadadeiras peitorais em indivíduos de peixe-boi da Amazônia.
- V. Verificar as variações entre os dois métodos acima citados (Radiográfico e Ultrassonográfico) para estimativa de idade.



### **3. Métodos Gerais**

#### **3.1 Animais utilizados**

No presente estudo foram utilizados animais vivos e mortos oriundos do Parque Aquático Robin Best do INPA/Manaus e do Centro de Preservação e Pesquisas de Mamíferos Aquáticos (CPPMA)/Presidente Figueiredo. Os indivíduos foram separados por sexo, tendo sido utilizados 37 machos e 35 fêmeas.

Desde 1974, o LMA/INPA resgata, reabilita e realiza estudos sobre a biologia, ecologia, fisiologia e manejo em cativeiro do peixe-boi da Amazônia. Localizado na cidade de Manaus, Amazonas, o Parque Aquático Robin Best possui atualmente três grandes piscinas que abrigam peixes-bois adultos, e uma área de berçário com pequenas piscinas redondas reservada aos filhotes.

O CPPMA, localizado na vila de Balbina, no município de Presidente Figueiredo-AM é um centro de reabilitação de animais aquáticos da Amazônia, mantido pela Eletrobrás Amazonas Energia. Implantado em 1985, o CPPMA possui três tanques para abrigar peixes-bois adultos e oito tanques para peixes-bois filhotes. O Centro foi inaugurado em 1992, por iniciativa da Eletronorte e IBAMA.

A utilização dos animais na pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais CEUA-INPA sob o número de protocolo 064/2012.

Os animais analisados foram separados em três grupos:

- Grupo I: Grupo para estudos longitudinais, no qual os indivíduos possuem múltiplas radiografias seriadas, repetidas em espaços de tempo (Tabela 01) em um total de 15 animais e 78 radiografias;
- Grupo II: Grupo de estudo seccional, no qual os indivíduos possuem somente uma radiografia ou várias radiografias separadas por idade (Tabela 02) em um total de 72 animais e 135 radiografias;
- Grupo III: Grupo no qual não se conhece o histórico de vida do animal (idade desconhecida) (Tabela 03) em um total de 49 animais e 49 radiografias.

**Tabela 1:** Animais utilizados no estudo longitudinal (Grupo I) e total de radiografias analisadas

	Nome	Radiografias por intervalo de tempo em anos		
		Idade no início	Idade no fim	N*
Fêmeas	Kiriri	0.2	3.6	6
	Cairé	0.8	3.4	6
	Parintins	0	5.3	2
	Adana	0.9	11.7	4
	Biba	2.8	12.1	6
	Boo	6.6	9.2	5
	<b>Total</b>			<b>29</b>
Machos	Xavante	3.3	8.8	7
	Tupy	2.9	5.5	5
	Matupá	0	1.1	3
	Caraíba	0.1	2.5	6
	Uirá	0.9	3.5	6
	Timbira	0.4	3.1	6
	Tucuna	0.5	4.8	7
	Itacoati	0	0.6	4
	Xingú	3.9	6.5	5
<b>Total</b>			<b>49</b>	

\* Igual ao número de radiografias coletadas

**Tabela 2:** Número de animais utilizados no estudo seccional (Grupo II) e total de radiografias analisadas

Tempo de cativeiro em anos	Fêmeas	Machos	Total
0.00-0.99	22	17	<b>39</b>
1.00-1.99	9	13	<b>22</b>
2.0-2.99	3	7	<b>10</b>
3.0-3.99	4	9	<b>13</b>
4.0-4.99	2	6	<b>8</b>
5.0-5.99	3	8	<b>11</b>
6.0-6.99	2	4	<b>6</b>
7.0-7.99	1	1	<b>2</b>
8.0-8.99	3	0	<b>3</b>
9.0-9.99	1	1	<b>2</b>
10.00-10.99	1	1	<b>2</b>
11.00-11.99	3	1	<b>4</b>
12.00-12.99	1	2	<b>3</b>
13.00-13.99	0	4	<b>4</b>
14.00-14.99	1	2	<b>3</b>
15.00-15.99	0	1	<b>1</b>
≥ 16.00	1	1	<b>2</b>
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>78</b>	<b>135</b>

No grupo para estudos seccionais (Grupo II, Tabela 02) a identidade do indivíduo não é importante, e sim a classe de tempo de cativeiro a qual ele pertence, por isso esse total mencionado acima de 72 animais inclui os 15 utilizados no estudo longitudinal somados a 57 animais que possuem uma radiografia somente.

**Tabela 3: Número de animais utilizados sem histórico (Grupo III)**

	<i>N</i>
Fêmeas	25
Machos	24
<b>Total</b>	<b>49</b>

Todos os 72 animais identificados no estudo (Tabela 04) foram filhotes órfãos resgatados vivos, alguns espécimes recuperados mortos, ou ainda indivíduos que chegaram aos tanques vivos, mas morreram antes do exame radiográfico. Nesses casos, os peixes-bois avaliados reuniam alguns aspectos físicos característicos de indivíduos com poucos dias ou semanas de vida: vestígios de cordão umbilical; umbigos não cicatrizados totalmente; pele de aspecto enrugado com presença de várias linhas verticais (pregas fetais); trocando de pele; tamanho e peso corporal reduzidos; e dentro do período de lactação (LMA, dados não publicados).

Animais recém-nascidos possuem uma camada de pele característica recobrando o corpo, a qual começa a descamar dias após o nascimento e termina a troca totalmente em torno de 15 dias (J.A.D`Affonseca Neto, comunicação pessoal). A presença de pregas fetais em *Trichechus manatus latirostris* (peixe-boi da Flórida) perdura por cerca de quatro ou cinco meses (Odell, 1982), mas em *T. inunguis* estima-se que esse período possa sofrer variação em alguns meses nos casos em que os filhotes encontram-se muito debilitados no momento do resgate (J.A.D`Affonseca Neto, comunicação pessoal).

A fase de lactação dura cerca de dois anos ou mais, e por isso, somente o fato de estar sob amamentação não constitui por si só um bom padrão de avaliação de tempo de vida. Sendo assim, optou-se por considerar no estudo somente os

animais que reuniam três ou mais dessas características e considerar para estimativa de idade o tempo de permanência em cativeiro (TC).

**Tabela 4: Filhotes órfãos de peixe-boi da Amazônia utilizados no estudo e suas medidas corporais (TSL) no momento de entrada nos tanques do LMA ou CPPMA.**

	Nome	TSL (cm)	Peso (kg)		Nome	TSL (cm)	Peso (kg)
<b>Machos</b>	Xiborena	90.5	12.1	<b>Fêmeas</b>	Neguinha	/	15.8
	Itacoati	97	18.1		Kayapó	95	11
	Barreirinha	104	12		Parintins	97	16.8
	Orebe	100	18.8		Tapauá	105	15
	Caraíba	100	21.8		Sem nome*	/	/
	Quarup	108	19.9		Sem nome*	/	/
	Terra Nova	105	27		Juruena	107	19.4
	Japurá	110.5	23.8		Umauá	/	23.5
	Matupá	119	25.8		Mura	102	19
	Timbira	100	15.6		Sem nome	91	12
	Tucuna	105	23.6		Baré	111	25.6
	Caraíba	100	21.8		Pretinha	/	9.4
	Uirá	89	15.5		Bimba	/	19.4
	Mitavaí	132	30.6		Kiriri	128	130
	Araçá	97	15.2		Poty	126	29.4
	Bariri	101	22		Mawa	111	24
	Tarová	134	27.2		Cairé	116.5	32
	Tupã	85	11.2		Maná	99	14
	Tupy	/	21.6		Sem nome	105	14
	Otinga	111.5	31		Adana	98.5	16.9
	Xavante II	113	31.2		Sem nome	100	17.5
	Xingú	103	17.8		Piranga	93.5	15
	Compensa	105	22.6		Cacau	87	11
	Oliveira	122.5	39		Beruri	115	38.5
	Castanho	102.5	15.8		Biba	97.6	31.2
	Tapajós	81	8.2		Poranga	97	16.4
	Itati	101	14.2		Piracauera	124.5	43.5
	Broocke	99	13.3		Boo	116.5	26
	Sol	119	25.5		Autazes	125	31
	Marcelo	124	30.0		Anori	96.5	15.4
	Maná	93.5	12.0		Nanica	94	13.6
	Mojú	80.5	10.0		Urucará	94	14.2
	Preto	135	42.0		Santinha	95.00	15.00
	Sem nome*	/	/		Cunhantaí	106	/
	Ituí	97	13.3		Barreirinha II	89.6	13.8
	Mapixari	159	/				
	Andirazinho	82	12				
	<b>Total</b>	<b>37</b>		<b>Total</b>	<b>35</b>		

\*Animais resgatados com resquícios do cordão umbilical

### 3.2 Anatomia da nadadeira peitoral

Externamente, as nadadeiras peitorais dos peixes-bois são arredondadas e todo o membro é recoberto por tecido epitelial de aspecto liso e cor escura. Ao contrário de todas as outras atuais espécies de peixes-bois (peixe-boi marinho (*T. manatus*) e peixe-boi africano (*T. senegalensis*)), o *Trichechus inunguis* (peixe-boi da Amazônia) não possui unhas associadas às falanges distais (fig. 01).

As nadadeiras peitorais dos peixes-bois são bem articuladas, permitindo movimentos multiaxiais e, embora não exista independência entre os movimentos das falanges dos diferentes dígitos, existe um movimento reduzido, porém diferenciado, entre os blocos das falanges distais e médias. A fusão proximal e distal do rádio e ulna encontrada nos adultos da espécie (Quiring & Harlan, 1953; Ronald et al. 1978) impede movimentos de pronação e supinação entre esses ossos (Cooper, 2008), contudo, observa-se que esses animais apresentam um amplo grau de movimento conseguindo girar quase completamente a face palmar das nadadeiras peitorais. Segundo Klima et al. (1980) outro mamífero aquático amazônico, o boto-vermelho (*Inia geoffrensis*), também apresenta uma nadadeira peitoral bem articulada e capaz de realizar movimentos de extensão, flexão, abdução, adução e rotação em duas direções. No caso do boto, existe uma articulação esferoide englobando a escápula, úmero e esterno (Klima et al., 1980).

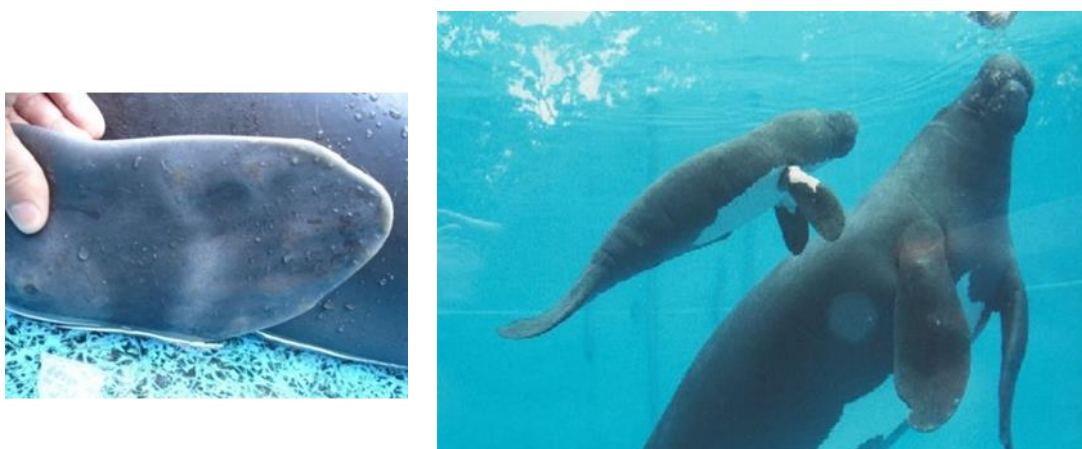


Figura 1. Aspectos externos da anatomia da nadadeira peitoral do peixe-boi da Amazônia. Fonte: Arquivo LMA

O membro torácico dos mamíferos em geral, é composto por: escápula, úmero, rádio, ulna, carpo, metacarpos e falanges (Araujo, 2003). A mão, ou nadadeira peitoral do peixe-boi da Amazônia possui seis ossos compondo o carpo, cinco metacarpos e várias falanges (proximais, médias e distais). O dígito IV é o maior e mais robusto, e as falanges no final dos dígitos são irregulares e de formato achatado (Cooper, 2008) conforme fig.02 abaixo.

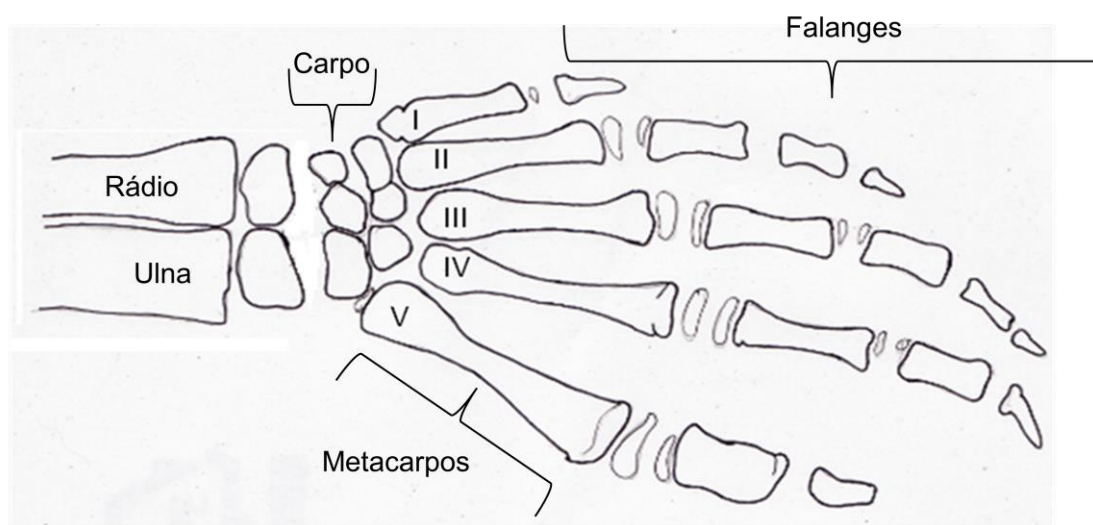


Figura 2. Anatomia óssea da mão e punho de *T. inunguis* identificando os ossos.

Os ossos carpais do gênero *Trichechus* são arrumados em uma fileira proximal contendo: *Radiale*, *Intermedium* e *Ulnare*; e uma fileira distal contendo: primeiro + segundo, terceiro e quarto ossos carpais (Quiring & Harlan, 1953; Ronald et al., 1978). Na fileira proximal, os dois primeiros são invariavelmente fusionados em um elemento que articula com o rádio e o *Ulnare* articula com a ulna (Quiring & Harlan, 1953; Ronald et al., 1978). Na fileira distal, o primeiro e o segundo osso são fusionados articulando com o *radiale-intermedium* enquanto o terceiro carpo articula com o *intermedium* e o carpo quatro articula com o *intermedium* e o *ulnare* (Kaiser, 1974; Ronald et al., 1978).

Dos cinco ossos metacarpais, os dois primeiros articulam com os carpos fusionados primeiro + segundo. Os metacarpos III e IV articulam com os carpos III e IV, respectivamente, e o quinto metacarpo articula com o *ulnare* (Quiring & Harlan, 1953; Ronald et al., 1978).

### **3.3 Técnicas Radiográficas**

Todas as radiografias, padronizadas segundo critérios preconizados por Bontrager (2003) (adaptados para a espécie conforme descrito abaixo) foram avaliadas, fotografadas, escaneadas e arquivadas física e digitalmente no LMA/INPA. Com exceção das imagens obtidas por meio de aparelho digital que somente foram arquivadas digitalmente.

Para a avaliação radiográfica do desenvolvimento ósseo foram utilizadas radiografias feitas pela equipe do LMA/INPA desde o ano de 1974, além de radiografias recentes do plantel atual de peixes-bois residentes nos dois centros de reabilitação de filhotes usados como locais de estudo realizadas ao longo dos anos 2011 e 2012.

As radiografias recentes foram obtidas com aparelho de raios-X portátil, marca POSKOM modelo PXM-40BT em animais vivos e de aparelho de raios-X digital Faxitron LX-60 em animais mortos. Os filmes utilizados foram da marca KODAK e FUJI tamanho 24x30, 35x35 e 30x40 dependendo do tamanho da nadadeira do animal e revelados manualmente em tanque de inox próprio para revelação com químicas da marca KODAK. O tempo de revelação variou entre 30 segundos e 1 minuto, dependente do tempo de uso dos reagentes.

Após calibragem do aparelho em animais com nadadeiras de tamanhos variados, optou-se por usar como padrão 66 Kv (Kilovolts) e 0.8 mAs (Mili-ampere/segundo) com distância foco-filme de 1m e distância objeto-filme de 0m (objeto em contato direto com o chassi) para evitar aumento da imagem. O ponto focal era posicionado na região do metacarpo III em animais filhotes ou centralmente na área desejada em animais mais velhos cujas nadadeiras eram maiores.

Os animais menores e mais leves eram retirados dos tanques pelos tratadores, colocados na sombra sobre colchões e contidos manualmente quando necessário. Os animais maiores e mais pesados, no entanto, eram manipulados sempre dentro dos próprios tanques após a secagem completa. Nesse caso o procedimento era feito somente pela manhã nos tanques sem proteção solar ou em outro momento do dia em tanques abrigados do sol. Independente da proteção

solar, os animais eram sempre mantidos úmidos por toalhas molhadas e/ou jatos de água direcionados por mangueiras.

Todos os envolvidos nos procedimentos de obtenção de imagens usaram proteção radiológica composta por: colete de chumbo com equivalência de 0.5mm Pb, protetor de tireóide com equivalência de 0.5mm Pb e um par de luvas plumbíferas tipo escudo com equivalência de 0.5mm Pb, todos confeccionados com borracha plumbífera flexível e Certificado ISO 9001:2000.

O manejo dos animais e os equipamentos de proteção individual utilizados na pesquisa e descritos acima foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais CEUA-INPA sob o número de protocolo 064/2012.

Com o animal em decúbito ventral, posicionou-se o chassi entre a nadadeira peitoral e a lateral do corpo com a nadadeira esticada longitudinalmente segurando-a pelo úmero ou rádio e ulna de forma que a incidência do feixe de raios-x fosse dorso-palmar com o aparelho posicionado sobre uma base de madeira lateralmente ao animal. Essa técnica eliminou a dificuldade em erguer e manter o aparelho imóvel acima do alvo e reduziu a necessidade de técnicos envolvidos para um mínimo de duas pessoas, uma disparando o feixe e outra segurando o chassi e a nadadeira do animal.

A idade dos animais foi estimada levando em consideração o histórico dos mesmos (data de entrada nos tanques e condições físicas).

### **3.4 Seleção geral de Imagens para avaliação radiográfica**

Após a execução e revelação das radiografias, as mesmas foram examinadas e somente aquelas que continham as seguintes condições foram consideradas no estudo:

- a) Bom contraste entre elementos radiopacos e radioluscentes, permitindo a correta visualização dos contornos ósseos.
- b) Nenhuma sobreposição dos metacarpos e/ou falanges, admitindo-se, no entanto, alguma sobreposição (nunca superior a 1/3 da largura do osso)



entre os elementos carpais e entre as epífises distais do rádio e ulna nos animais bem desenvolvidos.

c) A visualização de todos os elementos avaliados, mas alternativamente, a visualização somente dos elementos carpais, metacarpos e falanges proximais.

d) Imagens nítidas, não tremidas e sem artefatos de técnica.

Além das condicionantes acima descritas, o número de imagens analisadas variou de acordo com o objetivo almejado, tal variação será explicada caso a caso adiante nos capítulos I e II.

### **3.5. Análise geral dos dados**

#### **3.5.1. Objetivo específico I**

Para estimar a idade por meio da avaliação de radiografias dos membros torácicos de peixe-boi da Amazônia, foram utilizados três métodos (GP, TW e ER), para ambos os sexos, relacionando os achados nas radiografias por cada método e o tempo de cativeiro dos indivíduos analisados. Os achados para cada um dos três métodos testados foram analisados seguindo as metodologias específicas descritas no capítulo II, itens 2.1.1, 2.1.2 e 2.1.3, respectivamente.

#### **3.5.2. Objetivo específico II**

Para estimar a idade pela avaliação ultrassonográfica dos membros torácicos as medidas encontradas seriam correlacionadas com o tempo de cativeiro dos indivíduos e descritos em tabelas separadas por gênero e classes de tempo.

Contudo, o método foi falho, e não forneceu as medidas corretas necessárias para estimar idade.

### **3.5.3. Objetivo específico III**

Para avaliar a presença de variações sexuais no desenvolvimento ósseo das nadadeiras peitorais, os resultados para ambos os sexos, separados por classe etária, foram comparados utilizando diferentes testes estatísticos dependentes do tipo de dados encontrados (testes paramétricos e não-paramétricos) e descritos, caso a caso, nos resultados.

### **3.5.4. Objetivo específico IV**

Para construir um atlas de desenvolvimento ósseo do carpo, metacarpos e falanges, as imagens radiográficas das nadadeiras foram organizadas de modo a demonstrar temporalmente a evolução na fusão das epífises distais e desenvolvimento dos centros de ossificação, criando um guia visual para o crescimento ósseo em *T. inunguis*.

### **3.5.5. Objetivo específico V**

Para avaliar os dois métodos (radiográfico e ultrassonográfico), os resultados dos modelos utilizados (ER, GP e TW) seriam comparados por um teste de coincidência e paralelismo das retas para cada método em relação à idade cronológica. Contudo, como o método ultrassonográfico foi falho, tal comparação não pôde ser realizada. A precisão dos diferentes métodos radiográficos foi analisada comparando qualitativamente as janelas de resultados obtidos.

*Desenvolvimento Ósseo das Nadadeiras  
Peitorais do Peixe-boi da Amazônia avaliado por  
métodos radiográficos.*

Brum, W.M.; da Silva, V.M.F.

Manuscrito formatado para *Acta Amazonica*

---

## Resumo

A descrição do “padrão” de maturação óssea é importante como parâmetro básico de crescimento e desenvolvimento, e sua elucidação permite comparação com outras espécies e futuras inferências acerca de estimativas de idade e maturação sexual. Até o momento, nenhum estudo acerca do desenvolvimento radiográfico das estruturas ósseas das nadadeiras peitorais foi efetuado para o peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*), a qual se encontra classificada como vulnerável segundo a legislação brasileira. Além disso, não existe um método eficiente para avaliação de idade em indivíduos vivos de peixe-boi da Amazônia. O objetivo desse estudo foi preencher parte dessa lacuna de informações, analisando o desenvolvimento ósseo carpal e descrevendo a sequência de eventos ocorridos na nadadeira peitoral desde o nascimento até a maturidade óssea. Foram analisadas 184 radiografias de nadadeiras peitorais do peixe-boi da Amazônia, separadas por sexo, ao longo dos anos de 2012 e 2013 e o crescimento corporal total foi comparado com o crescimento das nadadeiras em 52 animais acompanhados desde sua entrada nos tanques de cativeiro até o ano de 2012. As radiografias foram observadas descrevendo a ordem, morfologia e tempo de evolução das epífises ósseas individualmente. Posteriormente, as imagens foram comparadas com as demais em busca de um padrão de desenvolvimento. *Trichechus inunguis* possui seis elementos carpais. A fórmula falangeal obtida foi 1-3-3-3-2/3 e apesar de possuírem um processo de ossificação endocondral demorado todas as epífises avaliadas fusionavam completamente com as respectivas diáfises. Conclui-se que a avaliação dos elementos carpais e grau de fusão das epífises dos metacarpos, falanges proximais e epífises distais do rádio e ulna são parâmetros mais confiáveis de avaliação da maturação óssea do que as epífises das falanges médias e distais. Para o peixe-boi da Amazônia, a completa maturação óssea das nadadeiras ocorre tardiamente, após os 18 anos. Contudo, a ocorrência de variações nas ordens exatas do aparecimento das estruturas, e nos tempos de maturação individuais dificulta o estabelecimento da “norma” padrão de desenvolvimento da espécie.

*Palavras-chave:* Ossificação endocondral, sirênio, desenvolvimento carpal, *Trichechus inunguis*, diagnóstico por imagem

## 1. Introdução

As duas atuais famílias da ordem Sirenia, os peixes-bois (Trichechidae) e os dugongos (Dugongidae), são notáveis por várias características incomuns entre os mamíferos (Beatty et al., 2012). Entre elas podemos destacar córneas vascularizadas (Harper et al., 2005), polifiodontia (Domning & Hayek, 1984; Beatty et al., 2012) e seis vértebras cervicais (Rommel & Lowenstine, 2001; Gheerbrandt et al., 2005) nos peixes-bois. Além de um esqueleto excessivamente denso, maciço e pesado (paquiosiose) em todos os sirênios (Domning & Bufrénil, 1991).

As possíveis explicações desse aumento de densidade óssea nos sirênios permanecem sob discussão. Alguns autores afirmam ser derivado de uma função reduzida da glândula tireóide (Fawcett, 1942), outros de que é derivado de um mecanismo evolutivo nesses mamíferos totalmente aquáticos, pois auxilia na obtenção de flutuabilidade neutra, tornando-os um pouco mais densos que a água (Wall, 1983). Gray et al. (2007) afirmam que a densidade corporal aumentada está associada a uma adaptação ao meio aquático que permite uma flutuabilidade estática em ambientes rasos, enquanto a redução da densidade, fato observado em cetáceos, permite um controle dinâmico de flutuabilidade útil em ambientes profundos.

Os peixes-bois não possuem cavidade medular nos ossos longos e costelas e as epífises ossificam lentamente e fusionam tardiamente com as respectivas diáfises (Fawcett, 1942). Tipicamente, a medula óssea nos ossos longos é o local primário da hematopoiese nos animais após o nascimento (Junqueira & Carneiro, 2004), contudo, visto que os peixes-bois não possuem tal compartimento, eles desenvolveram outros sítios de produção de células sanguíneas. O local principal de eritropoiese, mielopoiese, monopoiese e trombopoiese localiza-se nos corpos das vértebras e o local de linfopoiese permanece desconhecido (Bazzini et al., 1986). O corpo das vértebras também é o principal sítio de hematopoiese em outros mamíferos aquáticos como cetáceos e pinípedes (Britt & Howard, 1983).

Apesar destas características, a sequência da histogênese dos ossos nos peixes-bois é a mesma que a dos outros mamíferos, mas a taxa de reabsorção e reorganização nos ossos é muito mais lenta, com isso a ossificação endocondral na espécie é retardada. O crescimento em largura das epífises e a aposição óssea periosteal (ossificação pericondral) são, no entanto, relativamente normais. Isso explica as proporções gerais curtas e grossas dos ossos dos sirênios (Fawcett, 1942).

A descrição do “padrão” de maturação óssea é importante como parâmetro básico de crescimento e desenvolvimento, e sua elucidação permite comparação com outras espécies e futuras inferências acerca de estimativas de idade e maturação sexual (Hamada et al., 2003). Esse “padrão” é definido como a sequência de eventos para cada osso e é o mesmo para todos os indivíduos de uma mesma espécie (Hughes & Tanner, 1970).

Estudos radiográficos com ênfase no desenvolvimento ósseo e classificações etárias não são novidades na medicina veterinária e humana (Greulich & Pyle, 1959; Hughes & Tanner, 1970; Hughes & Tanner, 1973; Ogden et al., 1981; Guglielmini et al., 2002; Calzada & Aguilar, 1996; Hamada et al., 2003), variando o foco entre aparência morfológica (Hughes & Tanner, 1970; Ogden et al., 1981; Calzada & Aguilar, 1996; Hamada et al., 2003; Cooper & Dawson, 2009), morfometria (Hughes & Tanner, 1973; Calzada & Aguilar, 1996) e/ou densidade óssea (Guglielmini et al., 2002; Butti et al., 2007). Inúmeros trabalhos com primatas (Hamada et al., 2003), roedores (Hughes & Tanner, 1970; Hughes & Tanner, 1973), cetáceos (Ogden et al., 1981; Calzada & Aguilar, 1996; Guglielmini et al., 2002; Butti et al., 2007; Cooper & Dawson, 2009) e outras ordens diversas (Smith, 1960; Marks & Erickson, 1966; Hautier et al., 2012) estão disponíveis, contudo, tais estudos em sirênios não foram realizados. Windgate e Todd (1938) discutiram o padrão de fusão das epífises ósseas em sirênios baseando-se nos esqueletos de dezenove espécimes depositados em museus.

Hughes e Tanner (1970) destacaram a importância de se distinguir entre o tamanho absoluto de um animal em determinada idade e sua maturidade, pois cada indivíduo possui um tempo de desenvolvimento característico. Alguns se classificam como “*fast tempo*” (amadurecem mais rápido), outros como “*slow tempo*”

(amadurecem tardiamente), e por isso animais da mesma espécie podem possuir tamanhos corporais distintos em idades cronológicas semelhantes.

Apesar do crescente número de trabalhos sobre a espécie ao longo dos anos, alguns aspectos acerca da biologia e fisiologia dos peixes-boi da Amazônia permanecem desconhecidos. O desenvolvimento ósseo é considerado um importante referencial na determinação do nível de maturação geral do indivíduo e idade (Greulich & Pyle, 1959; Karaplis, 2008), que constitui um parâmetro fundamental nos estudos populacionais (Danil et al., 2004).

O tamanho corporal não é considerado um bom parâmetro para estimativas de idade no peixe-boi da Amazônia porque o mesmo sofre variações de acordo com o estado de saúde e nutrição (Colares, 2002; Albuquerque Jr, 2003; Amaral et al., 2010) e a avaliação de linhas de crescimento em unhas e dentes também não é possível pois *Trichechus inunguis* é polifiodonte (Domning & Hayek, 1984; Beatty et al., 2012) e não apresenta unhas (Husar, 1977; Rosas, 1994).

Até a presente data, tanto estudos acerca do desenvolvimento carpal das nadadeiras peitorais quanto estudos voltados para a estimativa de idade por meio de avaliações radiográficas em indivíduos vivos para a espécie não tinham sido desenvolvidos, este trabalho visa preencher em parte essa lacuna.

## **2. Métodos**

### **2.1 Crescimento corporal total x Crescimento das nadadeiras**

Todos os animais registrados nos arquivos de biometria do laboratório de mamíferos aquáticos do INPA e separados por sexo tiveram suas medidas de comprimento corporal total (TLSL) comparada com suas medidas de comprimento da nadadeira (CNAD) por meio de regressão simples com o objetivo de verificar como o crescimento da nadadeira ocorre comparado com o crescimento do esqueleto axial nos diferentes sexos.

Ao total foram utilizados 22 machos e 30 fêmeas e cada indivíduo contribuiu com somente um par de medidas escolhido aleatoriamente.

A TLSL é a medida, em centímetros (cm), obtida pela marcação da distância entre a ponta do focinho e o final da nadadeira caudal em linha reta. Realizada por meio de uma fita métrica esticada sobre duas hastes de madeira colocadas nas extremidades: cranial e caudal, de cada animal.

A CNAD é a medida, em centímetros (cm), obtida pela marcação da distância entre a base da nadadeira peitoral (região proximal do membro) e o seu ápice (região distal do membro). Realizada por meio de uma fita métrica esticada diretamente sobre as nadadeiras peitorais de cada animal.

## 2.2 Simetria bilateral

Com o intuito de determinar a presença de variações entre as nadadeiras peitorais direito-esquerda de um mesmo indivíduo, ambas as imagens de seis machos e seis fêmeas foram avaliadas visualmente e metricamente (Tabela 05). Os valores métricos obtidos em cada lado foram comparados estatisticamente por meio de teste-t.

**Tabela 5: Animais com radiografias de ambas as nadadeiras peitorais**

	Nome	Tempo de cativeiro	N*		Nome	Tempo de cativeiro	N*
<i>Machos</i>	Tucuna	5	2	<i>Fêmeas</i>	Adana	0.92	2
	Quarup	0.8	2		Adana	11.67	2
	Iporã	2.08	2		Barreirinha	0.33	2
	Orebe	0.8	2		Boo	9.25	2
	Japurá	0.17	2		Kiriri	2.08	2
	Araçá	1.08	2		Mawa	0.58	2
	<b>Total</b>		<b>12</b>		<b>Total</b>		<b>12</b>

\* N igual ao número de radiografias analisadas (nadadeira direita e nadadeira esquerda); Tempo de cativeiro em anos.

A avaliação visual seguiu os métodos descritos por Greulich e Pyle (1959) e Tanner e Whitehouse (1956) adaptados para a anatomia da espécie. O primeiro



observa a presença e ausência de centros de ossificação primários e secundários dos ossos do rádio, ulna, carpos, metacarpos e falanges, enquanto o segundo inclui uma análise mais detalhada das variações morfológicas desses centros ao longo do processo de ossificação. No segundo método, o grau de desenvolvimento de cada centro de ossificação é quantificado por meio de um índice, ao final todos os índices são somados e o grau geral de maturação óssea da nadadeira peitoral é obtido.

A avaliação métrica baseou-se no método descrito por Eklöf e Ringertz (1967) adaptado para a anatomia da espécie. Medidas de comprimento dos ossos metacarpais e falanges, e medidas de comprimento e largura dos ossos carpais e epífises distais do rádio e ulna foram obtidos e comparados. Para a realização das medidas, as imagens foram digitalizadas, calibradas e utilizou-se o programa *Image-pro Express* versão 4.5.1.3 para obtenção dos dados e geração das planilhas individuais.

As medidas de comprimento consistiram na distância retilínea entre dois pontos centrais marcados nas regiões epifisárias distais e proximais dos metacarpos e falanges e na distância retilínea entre dois pontos centrais nas extremidades proximais e distais dos carpos e epífises distais radiais e ulnares. As medidas de largura consistiram na distância retilínea entre dois pontos centrais marcados nas faces laterais e mediais dos carpos e epífises distais do rádio e ulna.

### **2.3 Sequência de desenvolvimento ósseo**

Na avaliação somente da sequência de desenvolvimento ósseo, sem considerar a velocidade e o tempo de aparecimento/fusão dos centros de ossificação, foram utilizadas todas as radiografias que possuíam as condicionantes estabelecidas *a priori*, exceto as radiografias dos animais classificados como “indeterminados”, totalizando 150 imagens avaliadas. As imagens foram visualizadas ao acaso e ordenadas baseadas na presença/ausência dos centros de ossificação primários e secundários e fusão das epífises ósseas, e também quanto a possíveis diferenças na morfologia desses elementos ao longo do desenvolvimento.

A identificação individual das radiografias foi ocultada, permanecendo somente a indicação do gênero, de modo que o avaliador ordenava as imagens sem influência do tempo de cativeiro e histórico do animal. Foram realizadas três observações e ordenações, em momentos distintos, por um único observador e os resultados foram comparados qualitativamente quanto a possíveis mudanças na classificação de ordenação.

As radiografias foram separadas em dois grupos: machos (84 radiografias) e fêmeas (66 radiografias). E os eventos observados em cada grupo foram descritos de forma independente, ao final do qual foram comparados qualitativamente quanto a possíveis diferenças.

Após a avaliação das radiografias dos animais com histórico de vida conhecido, os animais classificados no grupo III (animais de idade não conhecida) foram avaliados objetivando a observação de algum estágio de evolução diferente do descrito para os animais de histórico comprovado.

Para validação dos resultados, os animais que possuíam radiografias seriadas foram identificados após análise, e suas radiografias novamente observadas para confirmação de que estavam classificadas na ordem cronológica correta, evidenciando a correta interpretação da ordem dos eventos observados.

#### ***2.4 Tempo de evolução dos centros de ossificação***

Para a avaliação da velocidade e do tempo de evolução dos centros de ossificação, foram retiradas da amostra todas as imagens de animais cujo histórico de vida não era conhecido (Grupo III).

O tempo de aparecimento e fusão das estruturas nas nadadeiras foi determinado com o uso de regressões logísticas, obtendo-se a probabilidade de tal fato ocorrer.

### 3. Resultados

#### 3.1 Crescimento da nadadeira peitoral de *T. inunguis*

Os resultados das regressões entre comprimento linear corporal total (TLSL) e comprimento da nadadeira para machos e fêmeas estão apresentados na Tabela 06 e figura 03 A e B abaixo.

**Tabela 6. Resultados das regressões lineares de comprimento corporal total (TLSL)/Comprimento da nadadeira peitoral (CNAD) para machos e fêmeas de peixe-boi da Amazônia e da comparação entre as regressões de ambos os sexos.**

Regressão Linear TLCL/CNAD	N*	Média X	Média Y	F	R <sup>2</sup>	Equação	Coefficiente de correlação
Machos	22	158.77	35.93	722.841 (p < 0.0001)	0.9731	Y' = 1.7429 + 0.2153X	0.9864
Fêmeas	31	158.25	35.65	1086.179 (p < 0.0001)	0.9749	Y' = 6.0196 + 0.1872X	0.9874
Comparação entre regressões	Teste t, Coefs. Regressão	gl	p-valor	Teste t, Interceptos	gl	p-valor	
Machos x Fêmeas	2.915	48	0.0054	0.3719	49	0.7115	

\*N igual a número de pares de dados utilizados (TLSL x CNAD)

Tanto a regressão para machos quanto a regressão para fêmeas foram significantes ( $R^2_{(machos)} = 0.9731$  e  $R^2_{(fêmeas)} = 0.9749$ ;  $p < 0.0001$ ) com altos valores positivos nos coeficientes de correlação ( $0.9864_{(machos)}$  e  $0.9874_{(fêmeas)}$ ) entre o comprimento corporal linear total e o comprimento das nadadeiras. Ou seja, o crescimento das nadadeiras acompanha o crescimento corporal de forma positiva, aumentando de tamanho à medida que o indivíduo cresce e fica mais velho.

Entre os machos o menor indivíduo analisado tinha 97 cm de TLSL e 23 cm de CNAD e o maior tinha 259.5 cm de TLSL e 61 cm de CNAD, a média e desvio padrão da proporção entre TLSL/CNAD foi de  $4.40 \pm 0.2$ . A menor fêmea analisada tinha 89.5 cm de TLSL e 22 cm de CNAD e a maior tinha 270.5 cm de TLSL e 59 cm de CNAD, a média e desvio padrão da proporção entre TLCL/CNAD foi de  $4.38 \pm 0.3$ .

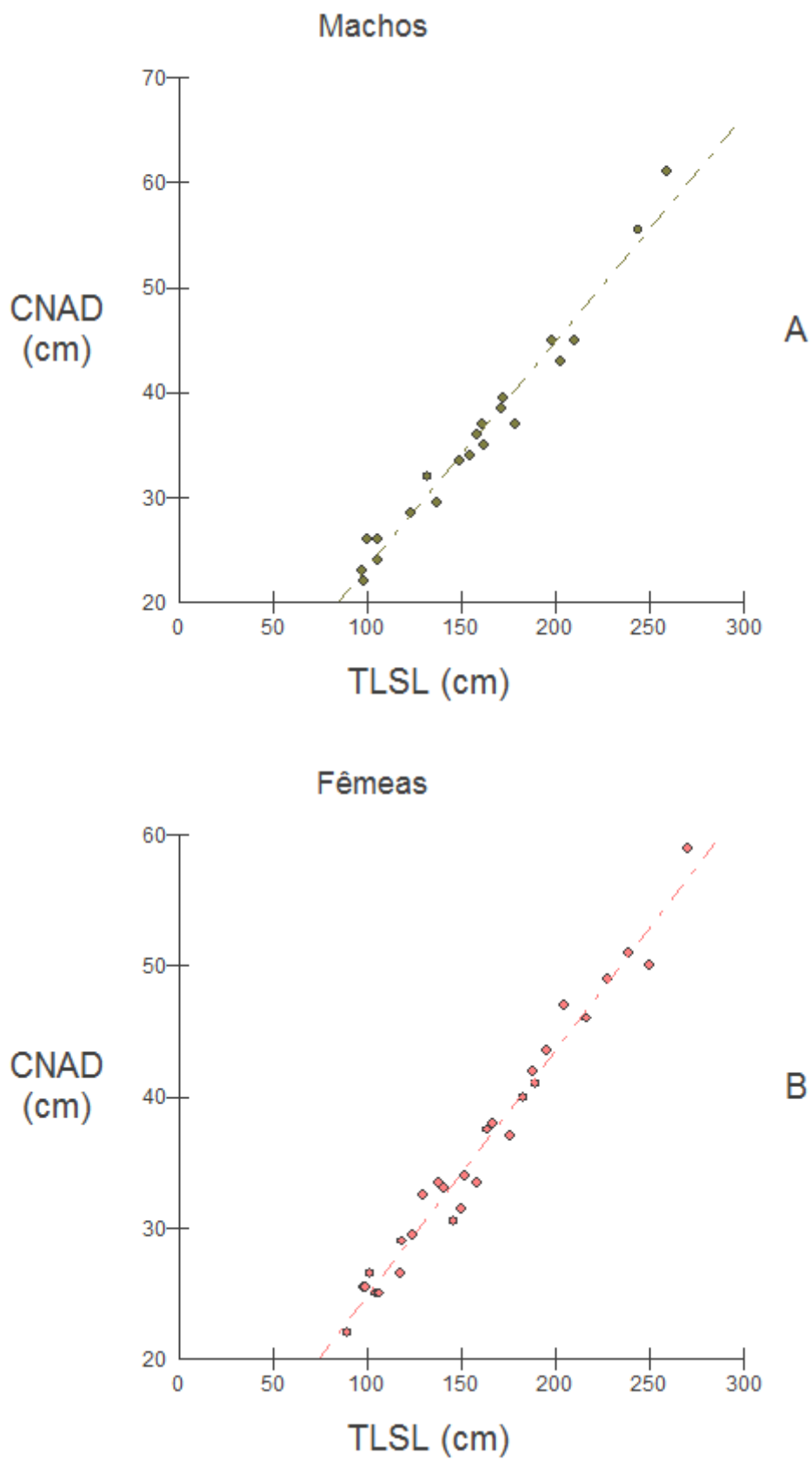


Figura 3. Regressão linear entre o Comprimento Linear corporal total (TLCL) e o comprimento da nadadeira peitoral para machos (A) e fêmeas (B).

Esse crescimento, contudo, não é simétrico, conforme observado nos gráficos, o comprimento linear aumenta mais rapidamente do que o comprimento das nadadeiras (alometria positiva). Quando comparadas, as regressões entre machos e fêmeas percebe-se que o Teste *t* dos Coeficientes de Regressão (1.7429 e 6.0196, respectivamente) é muito significativo (*p*-valor = 0.0054), sendo, portanto, dissimilares. Os Interceptos, por sua vez, não evidenciam diferenças, eis que o *p*-valor do Teste *T* para esses Coeficientes não é significativo do ponto de vista estatístico (*p*=0.7115).

### 3.2 Simetria bilateral

Machos e fêmeas não apresentaram diferenças entre a nadadeira direita e a nadadeira esquerda quando observados visualmente (métodos de GP e TW), pois ambas as imagens continham os mesmos elementos em igual grau de desenvolvimento, e quando avaliados metricamente (método ER), o resultado do teste-t foi não significativo com 99% de confiança ( $p_{\text{machos}} = 0.3656$  e  $p_{\text{fêmeas}} = 0.4543$ ;  $H_0 = H_1$ ) de acordo com a tabela 07 abaixo.

**Tabela 7. Resultados do Teste-t para ambas as nadadeiras peitorais em machos e fêmeas de peixe-boi da Amazônia.**

	<i>N</i> *	Média	Variância	Graus de liberdade	<i>p</i>	<i>T</i>
Machos	88	2.5673	2.3228	174	0.3656	-0.3443
	88	2.6464				
Fêmeas	129	2.1456	3.0102	256	0.4543	0.1151
	129	2.1207				

\**N* igual ao número de medidas obtidas em cada nadadeira somando-se os seis indivíduos de cada sexo, os valores repetidos para cada gênero representam as nadadeiras direita e esquerda, respectivamente.

### 3.3 Desenvolvimento ósseo das nadadeiras peitorais em machos e fêmeas

Não ocorreu diferença aparente por meio de avaliação visual na ordem de desenvolvimento dos centros de ossificação entre machos e fêmeas. Por isso, a

descrição a seguir acontece em ambos os gêneros e exceções serão descritas ao longo do texto.

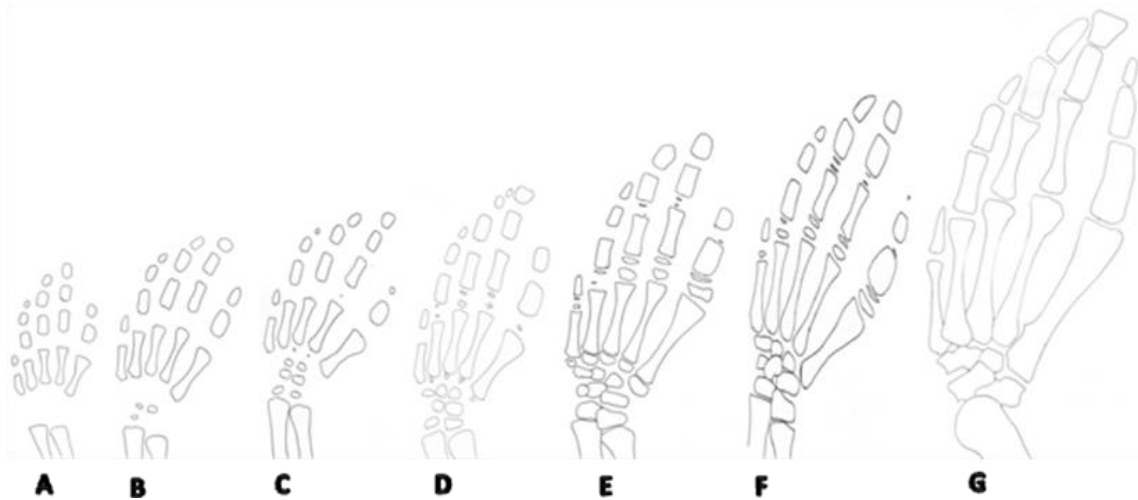


Figura 4. Esquema simplificado do desenvolvimento ósseo em *T. inunguis*. A: indivíduo imaturo fisicamente (filhote com menos de seis meses de idade). B, C, D, E, F: sequência de maturação óssea (indivíduos imaturos fisicamente: filhotes, jovens e adultos). G: indivíduo maturo fisicamente (adulto com mais de 18 anos). O número de centros de ossificação aumenta com a idade. Os ossos do carpo aparecem a partir de B, todas as epífises fusionam (G) e alguns indivíduos desenvolvem uma quinta falange distal (F e G).

### 3.3.1 Rádio e Ulna

A escolha do posicionamento radiográfico descrita no item 3.3 de “Métodos Gerais” permite somente a avaliação da região distal do rádio e ulna, por isso a descrição que se segue leva em consideração essa limitação. Inicialmente todos os animais apresentam as epífises de ambos os ossos ausentes e posteriormente a epífise distal do rádio aparece radiograficamente primeiro, seguida pela epífise distal da ulna. As epífises se desenvolvem crescendo em largura e comprimento até tornarem-se tão largas quanto às respectivas metáfises, então o processo de fusão se inicia. Ao final do processo de fusão tanto as epífises quanto as metáfises de ambos os ossos se fundem entre si, formando uma peça única de rádio+ulna fusionados distalmente (Fig. 5). Observações ocasionais da região proximal desses elementos em algumas radiografias demonstram também a fusão ocorrendo entre

as epífises do rádio e da ulna em momento diferenciado e anterior à fusão distal desses ossos (fig. 6).

O rádio articula distalmente com os carpos *radiale* e *intermedium* e a ulna articula distalmente com o *ulnare*. Quando relacionados com o aparecimento dos ossos do carpo verifica-se uma grande variação entre os indivíduos, alguns apresentando um, dois ou mesmo nenhum elemento carpal no momento do aparecimento da epífise radial. O aparecimento da epífise ulnar iniciou somente após a presença de dois ou três ossos do carpo (Ulnar + intermédio + terceiro).

A presença somente das epífises distais do rádio e da ulna sem nenhum outro centro de ossificação ocorreu em dois de um total de 17 filhotes machos avaliados com idade inferior a um ano e em um filhote fêmea de um total de 21 avaliadas com a mesma faixa etária dos machos, todos radiografados *post mortem*.



Figura 5. Radiografia de indivíduo macho de peixe-boi da Amazônia, de idade não conhecida, demonstrando a fusão distal do rádio e ulna (seta branca).

### 3.3.2 Carpos

Ao nascimento não existe nenhum dos centros de ossificação dos ossos do carpo. Em geral, esses ossos apresentam somente um centro de ossificação que aumenta de tamanho com a idade, contudo foram observados três animais com radiografias seriadas (Grupo I) (dois machos de um total de nove animais e uma fêmea de um total de seis indivíduos) que apresentaram dois ou três centros pequenos que se fundiram rapidamente e continuaram o crescimento como um único centro. A disposição espacial permaneceu a mesma ao longo de todo o tempo nos animais analisados, variando somente no tamanho dos ossos (figs. 4 e 5., acima).

Essa região é composta por seis ossos dispostos da seguinte forma: a fileira proximal contém um *radiale* (radial), um *intermedium* (intermédio) e um *ulnare* (ulnar); a fileira distal contém o segundo, o terceiro e o quarto carpal. O primeiro osso carpal aparentemente está ausente na espécie, pois não foram encontradas evidências radiográficas de que esse elemento inicie seu desenvolvimento e depois fusione com o segundo osso carpal.

Apesar de diferirem em tamanho, quando completam seu desenvolvimento ósseo, esses ossos mantêm uma posição muito próxima, podendo facilmente se sobrepor mesmo em casos de pouca angulação do punho. Por isso, a obtenção de medidas desses ossos torna-se cada vez mais difícil à medida que os animais vão amadurecendo.

Conforme descrito anteriormente no item 3.3.1, entre os ossos carpais da fileira proximal, o *radiale* e o *intermedium* articulam com o rádio e o *ulnare* articula com a ulna proximalmente. Distalmente, o *radiale* articula com o segundo carpal; o *intermedium* articula com o terceiro carpal; e o *ulnare* articula com o quarto carpal e com o metacarpo V (fig. 5). Entre os ossos carpais da fileira distal: o segundo carpal articula com os metacarpos I e II; o terceiro osso carpal articula com os metacarpos II e III; e o quarto osso carpal articula com os metacarpos III e IV, distalmente (fig. 6).



Os centros de ossificação carpais iniciam seu desenvolvimento com formato circular e ao longo do crescimento vão se tornando cada vez mais semelhantes a retângulos (com a largura sempre maior do que a altura).



Figura 6. Radiografia da nadadeira peitoral de peixe-boi da Amazônia fêmea demonstrando as articulações intercarpais (seta branca) e o fusionamento proximal do rádio e ulna (seta vermelha) anteriormente ao fusionamento distal.

A ordem de aparecimento dos centros de ossificação carpais apresentou-se da seguinte forma: 1ª *ulnare*, 2ª *intermedium*, 3ª quarto carpal, 4ª terceiro carpal, 5ª segundo carpal e 6ª *radiale*.

### **3.3.3 Metacarpos**

O peixe-boi da Amazônia apresenta cinco metacarpos (I, II, III, IV e V), representando um dígito cada. Ao nascimento apresentam a forma típica dos ossos longos, com as regiões periféricas mais largas do que a região central, porém as epífises só se tornam visíveis radiograficamente após o aparecimento de pelo menos quatro ossos carpais e as epífises distais do rádio e ulna. As epífises proximais aparecem antes das epífises distais, e fusionam com as respectivas metáfises também antes da fusão das epífises distais em todos os metacarpos. As epífises distais surgem após o aparecimento das epífises proximais, porém sempre antes da fusão das mesmas.

As articulações entre os metacarpos e os ossos do carpo foram descritas no item 3.3.2 ao abordar as articulações intercarpais e também podem ser visualizadas na figura 6.

Aparentemente os machos desenvolvem a epífise distal do metacarpo V antes da epífise proximal correspondente. A ordem de fusão, contudo, permanece igual, com a epífise proximal sempre fusionando antes da epífise distal.

O desenvolvimento das epífises começa na forma de uma linha ou círculo radiopaco menor do que a metáfise, o qual vai aumentando de tamanho até tornar-se igual ou mais largo e iniciar sua fusão. Quando o animal atinge a maturidade óssea, as epífises estão totalmente fusionadas com as metáfises e cessa o crescimento longitudinal desses ossos (fig. 5).

A ordem de aparecimento das epífises pode variar entre os indivíduos, mas na maioria das imagens analisadas deu-se da seguinte forma: 1ª Epífises proximais dos metacarpos III e IV; 2ª Epífise proximal do metacarpo V; 3ª Epífise distal do metacarpo III e epífise proximal do metacarpo II; 4ª Epífise distal do metacarpo IV; 5ª Epífises proximal do metacarpo I e distal do metacarpo II; 6ª epífise distal do metacarpo V; 7ª epífise distal do metacarpo I.

A ordem de fusão das epífises também pode variar entre os indivíduos, mas de maneira geral ocorre na seguinte sequência: 1ª epífise proximal do metacarpo II; 2ª epífise proximal do metacarpo III; 3ª epífise proximal do metacarpo IV; 4ª epífise

proximal do metacarpo V; e 5<sup>a</sup> epífise proximal do metacarpo I; As epífises distais fusionam após a fusão de todas as epífises proximais e seguem a mesma ordem que as descritas acima.

### 3.3.4 Falanges

A fórmula falangeal é 1 - 3 - 3 - 3 - 2/3. Ao nascimento todos os animais avaliados apresentavam a fórmula 1 - 3 - 3 - 3 - 2, porém alguns indivíduos desenvolveram tardiamente uma terceira falange distalmente ao dígito V. Das fêmeas avaliadas, 28% (dez indivíduos) desenvolveram uma falange distal ao dígito V contra 35% nos machos (13 indivíduos) no total. O aparecimento de centros de ossificação secundários nas falanges distais seguiu, aparentemente, a ordem: 1<sup>o</sup> epífises proximais das falanges proximais III e IV; 2<sup>o</sup> epífise proximal da falange proximal V; 3<sup>o</sup> epífise proximal da falange proximal II; 4<sup>o</sup> epífises distais das falanges proximais III e IV; 5<sup>o</sup> epífise proximal da falange proximal I; 6<sup>o</sup> após esses aparecimentos as outras epífises não seguiram uma ordem. Percebeu-se que alguns animais aparentemente possuíam um número maior de falanges nos dígitos III e/ou IV, no entanto, tratava-se na realidade de um grande centro de ossificação secundário distal que fusiona com o tempo.

Morfologicamente as falanges também possuem grande variação, tornando-se mais largas e arredondadas à medida que o animal se torna mais maturo. As falanges distais I, II e III tornam-se triangulares (Fig. 5 e 7A). A falange distal do dígito IV apresenta um formato característico trapezóide (Fig. 5 e 7B).

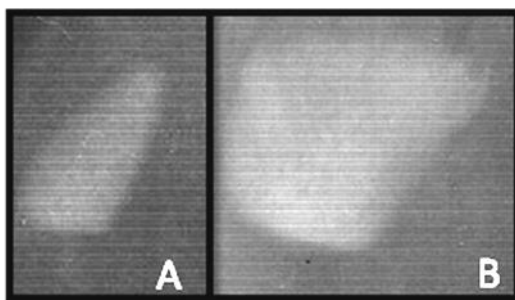


Figura 7. Imagem de radiografia evidenciando o formato típico triangular das falanges distais I, II e III (A) e trapezóide da falange distal V (zoom digital de 2x) (B).

Independente da ordem global de aparecimento, as epífises proximais aparecem antes das epífises distais em uma mesma falange e fusionam primeiro também.

### **3.4 Tempo de aparecimento dos centros de ossificação carpais**

A predição do tempo de fusão das epífises dos ossos por regressão logística não foi possível porque o número de animais com tais características foi insuficiente. Contudo, a época relativa de aparecimento dessas estruturas e dos ossos carpais foi determinada com sucesso. Os gráficos das regressões logísticas para cada osso carpal separados para fêmeas e machos estão apresentados nos Anexos I e II, respectivamente.

**Tabela 8. Tempo de aparecimento das estruturas ósseas em fêmeas de peixe-boi da Amazônia.**

Estrutura óssea	Fêmeas	
	Tempo de cativeiro (anos)	Probabilidade
Carpo ulnar	0.2	50%
Carpo intermédio	0.2	50%
Epífise Radial	0.3	50%
Terceiro carpo	0.4	50%
Epífise Ulnar	0.5	50%
Quarto carpo	0.6	50%
Epífise proximal do metacarpo III	0.9	50%
Epífise proximal do metacarpo IV	0.9	50%
Segundo carpo	1.1	50%
Epífise proximal do metacarpo II	1.1	50%
Epífise proximal do metacarpo V	1.1	50%
Epífise distal do metacarpo III	1.3	50%
Epífise distal do metacarpo IV	1.4	50%
Carpo radial	1.4	50%
Epífise distal do metacarpo V	1.7	50%
Epífise proximal do metacarpo I	2.2	50%
Epífise distal do metacarpo II	2.6	50%
Epífise distal do metacarpo I	5.6	50%

**Tabela 9. Tempo de aparecimento das estruturas ósseas em machos de peixe-boi da Amazônia.**

Estrutura óssea	Machos	
	Tempo de cativeiro (anos)	Probabilidade
Carpo ulnar	0.3	50%
Carpo intermédio	0.4	50%
Epífise Radial	0.4	50%
Epífise Ulnar	0.7	50%
Terceiro carpo	0.7	50%
Quarto carpo	0.8	50%
Epífise proximal do metacarpo III	1.3	50%
Epífise proximal do metacarpo IV	1.3	50%
Epífise proximal do metacarpo II	1.3	50%
Epífise distal do metacarpo V	1.5	50%
segundo carpo	1.5	50%
Epífise distal do metacarpo III	1.5	50%
Epífise proximal do metacarpo V	1.6	50%
Epífise distal do metacarpo IV	1.9	50%
Epífise distal do metacarpo II	1.9	50%
Carpo radial	2.1	50%
Epífise proximal do metacarpo I	2.1	50%
Epífise distal do metacarpo I	5.9	50%

Não foi possível uma exata definição do tempo de aparecimento dos centros de ossificação porque existe uma variação natural entre o tempo de maturação óssea de cada indivíduo. Contudo, baseando-se nas probabilidades resultantes das regressões, foram montadas duas tabelas (Tabelas 08 e 09) relacionando o tempo de cativeiro aproximado no qual os indivíduos possuem 50% de probabilidade de apresentarem tal detalhe ósseo especificado nas linhas das tabelas.

Observando as imagens radiográficas, o menor tempo em que ocorreu a fusão das epífises do rádio e ulna em machos e fêmeas foi de 11,7 e 14,9 anos de cativeiro, respectivamente. Porém foram encontrados indivíduos fêmeas com até 17,7 anos de cativeiro que ainda possuíam as epífises desses ossos não fusionadas. De maneira semelhante, foram encontrados machos com até 20,3 anos de cativeiro com a mesma característica. As epífises proximais dos metacarpos tiveram um tempo mínimo de fusão de 6,6 anos em fêmeas e todos os animais observados com mais de 8,2 anos já tinham todas as epífises proximais fusionadas.

Em machos, esse tempo variou entre 6,3 no mínimo e somente animais com mais de 10,9 anos possuíam todas as epífises proximais metacarpais fechadas.

#### 4. Discussão

Devido ao número limitado de trabalhos acerca do desenvolvimento ósseo em sirênios, a maioria da literatura utilizada para comparação no presente estudo envolve diferentes ordens de mamíferos, principalmente outros mamíferos aquáticos, como os cetáceos.

Quando comparado com o crescimento do esqueleto axial (comprimento linear corporal total – TLSL) as nadadeiras peitorais estão se desenvolvendo de maneira correspondente. Resultado semelhante ao encontrado por outros autores trabalhando com mamíferos diversos. Calzada e Aguilar (1996) observaram que *Stenella coeruleoalba* (Golfinho-listrado) (Cetacea) também possui uma relação linear entre os comprimentos das nadadeiras e do corpo. Isto significa que o crescimento dessa região pode ser avaliado positivamente em relação ao tempo de vida desse animal.

O aumento em comprimento linear deve-se aos estágios de maturação óssea das estruturas componentes das nadadeiras, mais especificamente, os ossos longos (úmero, rádio, ulna, metacarpos e falanges) que sofrem ossificação do tipo endocondral. Tais processos podem ser facilmente observados no peixe-boi da Amazônia por meio de avaliação radiográfica, e as descrições dos eventos, mudanças de forma e crescimento constituem estágios que podem ser relacionados com outras mudanças biológicas e/ou cronológicas. Ou seja, é possível observar a evolução cronológica dos peixes-bois pelo acompanhamento das nadadeiras.

Machos e fêmeas apresentam esse desenvolvimento de forma diferente com as regressões apresentando diferenças estatísticas quando os interceptos são comparados e com os machos atingindo comprimentos maiores no momento da maturação óssea das nadadeiras (fusionamento completo de todas as epífises ósseas). Esse dado, no entanto pode estar mais relacionado ao fato de que os machos estão terminando o desenvolvimento ósseo das nadadeiras após as fêmeas

do que resultado de um crescimento diferenciado. Diferença semelhante de tamanho no momento da maturação óssea das nadadeiras ocorre em *Stenella coeruleoalba* (Calzada & Aguilar, 1996). Os peixes-bois da Amazônia não apresentam diferenças no tamanho corporal entre os sexos (Rosas, 1994) nem diferenças entre as regressões de massa corporal e comprimento retilíneo total para machos e fêmeas (Amaral et al., 2010). Adicionalmente, esses autores não encontraram diferenças estatísticas entre o tamanho dos animais cativos e os de vida livre estudados.

Utilizando somente animais cativos, Colares (2002) estimou o crescimento assintótico de peixes-boi da Amazônia em  $214.93 \pm 2.42$  para fêmeas e  $216.53 \pm 1.52$  para machos. Segundo Vergara-Parente et al. (2010) machos e fêmeas de *Trichechus inunguis* de vida livre apresentam curvas de crescimento diferenciadas, com os machos apresentando uma taxa de crescimento anual de 0.09 cm e um tamanho curvilíneo máximo de 299 cm, enquanto fêmeas possuem taxa de crescimento de 0.24 cm ao ano e tamanho máximo de 256 cm. Albuquerque Jr. (2003), trabalhando com animais cativos, também encontrou diferenças entre as taxas de crescimento para machos e fêmeas, com 0.21 cm/ano e 0.33 cm/ano, respectivamente. Alguns dos animais analisados por Albuquerque Jr (2003) também foram incluídos no presente estudo.

A simetria bilateral foi confirmada em ambos os gêneros, concluindo ser irrelevante o lado do membro avaliado, o que facilita o estudo nesses animais porque a manipulação de um adulto visando mudança de posição requer grande esforço por parte dos manipuladores devido ao peso elevado do animal. Simetria bilateral é uma característica dos mamíferos, e a igualdade entre ambas as nadadeiras peitorais foi confirmada nos cetáceos por Ito e Miyazaki (1990). No entanto, Ogden et al. (1981) observaram diferenças ocasionais no tempo de aparecimento dos centros secundários de ossificação em falanges em *Phocoenoides* e *Globicephala*, mesmo assim os espécimes ainda apresentaram um alto grau de simetria bilateral.

A descrição morfológica dos eventos de ossificação, a ordem de ocorrência e a fórmula óssea final são parâmetros bastante úteis na determinação da norma de desenvolvimento ósseo geral e o presente estudo apresenta a primeira descrição desta parte do corpo para o peixe-boi da Amazônia. Trabalhos focados em outras

regiões do corpo, assim como estudos acerca do desenvolvimento pré-natal (ontogenia) ainda precisam ser realizados para que se tenha um panorama geral dos eventos de ossificação da espécie.

Radiograficamente, machos e fêmeas são idênticos, não apresentando estrutura alguma diferente, tanto numericamente quanto morfológicamente nas nadadeiras peitorais. O dimorfismo sexual na espécie permanece relacionado aos órgãos reprodutores, localização e abertura dos órgãos genitais. Resultado diferente do encontrado por Mellor et al. (2009) acerca das “vaquitas” (*Phocoena sinus*, Cetacea), cujas fêmeas apresentam um número maior de elementos ossificados nas nadadeiras peitorais. Contudo, a identificação do sexo baseada no exame dos ossos em outras espécies baseia-se, principalmente, em diferenças no comprimento e diâmetro (Calzada & Aguilar, 1996), fatores que não foram avaliados nesse estudo.

Foram observados para *T. inunguis* tanto o fusionamento das epífises do rádio e ulna entre si descrito por Quiring e Harlam (1953) para *T. manatus latirostris*, quanto um espaço amplo com formato oval resultante dessa ligação entre esses ossos (Kaiser, 1974). Contudo, diferente do que esses autores relatam para *T. manatus latirostris*, os elementos carpais *radiale* e *intermedium* não fusionam, mantendo sua independência. A ausência de fusão entre o primeiro e o segundo ossos carpais nas radiografias analisadas ocorreu porque somente um centro de ossificação foi identificado, e ao que tudo indica, o primeiro carpo está ausente em *T. inunguis*.

Quiring e Harlam (1953) mencionam que o formato carpal com a largura alongada e o fato de articular com mais de um metacarpo confirmam a afirmação de que se trata de dois elementos carpais fusionados (primeiro + segundo), porém no peixe-boi da Amazônia todos os elementos carpais da fileira distal articulam com mais de um osso metacárpico. Além disso, estruturas ósseas curtas e largas são características de animais que possuem ossificação endocondral lenta e ossificação periosteal normal (Calzada & Aguilar, 1996; Mellor et al., 2009), conforme observado no gênero *Trichechus*.

O quinto dígito possui a fórmula falangeal variando em dois ou três ossos, mas no caso de três ossos a falange distal só começa a se desenvolver tardiamente.



A maioria dos adultos avaliados apresentava a fórmula falangeal igual a 1-3-3-3-3, fato que poderia indicar o aparecimento tardio da quinta falange distal como uma característica da espécie. O aparecimento tardio de falanges é comum em cetáceos, sendo esses animais conhecidos por seu número elevado de falanges, atingindo até dez falanges em um dígito (Calzada & Aguilar, 1996; Fedak & Hall, 2004; Mellor et al., 2009). Em algumas espécies de cetáceos as falanges podem fundir com os metacarpos ou outras falanges (Calzada & Aguilar, 1996), fato que não foi observado no peixe-boi da Amazônia. Essa ausência de fusão auxilia na mobilidade maior encontrada nas nadadeiras desses animais, que conseguem realizar movimentos de flexão, extensão, adução, abdução e rotação. Sendo facilmente observados comportamentos de “caminhada” no fundo dos tanques.

A ausência de anomalias ósseas e de dígitos supra ou infranumerários nos peixes-bois da Amazônia analisados nesse estudo não significa que não possam ocorrer nesta espécie. Ogden et al. (1981) observaram incidência de desenvolvimento unilateral congênito anormal em cerca de 1% das baleias-piloto (*Globiophala* sp.) cujas nadadeiras peitorais foram analisadas radiograficamente.

A morfologia das falanges, especialmente as falanges distais, é bem característica e de maneira geral essas falanges têm sua forma modificada para acomodar as unhas associadas. Como *T. inunguis* é desprovido de unhas, a falta de tais estruturas na espécie aparentemente resulta em formatos radiográficos triangulares e trapezoidais à medida que o animal se desenvolve, contrastando com o formato inicial retangular ou circular. Em *Stenella coeruleoalba*, Calzada e Aguilar (1996) encontraram padrões morfológicos retangulares mudando para circulares nas falanges à medida que essas estruturas se tornavam mais distais. Segundo Dawson (2003) golfinhos da família Phocoenidae apresentam mudanças morfológicas nas diáfises proximais das falanges, as quais progridem de formatos ovóides, para triangulares e finalmente retangulares devido ao atraso no processo de ossificação endocondral.

Esse padrão também foi observado em *Trichechus inunguis*, e a ossificação endocondral lenta encontrada também nessa espécie parece ser o fator contribuinte para essas mudanças. A ossificação pericondral, no entanto, não é atrasada nos peixes-bois, e por isso as falanges apresentam os formatos descritos acima,

iniciando com a forma arredondada e terminando retangulares, triangulares ou trapezoidais. Diferentemente, golfinhos da família Phocoenidae retêm várias falanges em formato arredondado devido a um atraso presente também na ossificação pericondral (Dawson, 2003).

O fato das epífises das falanges médias e distais em *Trichechus inunguis* sofrerem grande variação individual entre presença e ausência sinaliza que tais fatores não são bons indicativos de maturação óssea, resultado semelhante ao encontrado por Calzada e Aguilar (1996) e diferente dos encontrados por Hui (1979), ambos trabalhando com cetáceos.

A fórmula carpal da espécie distribuída em duas fileiras de três ossos também difere de outras espécies: humanos e cães domésticos apresentam duas fileiras de quatro elementos (König & Liebich, 2011), dugongos (*Dugong dugon*) possuem cinco elementos (Cooper, 2008) e cetáceos podem variar inter e intraespecificamente, com indivíduos apresentando números de carpos variáveis (Gihl et al., 1982; Calzada & Aguilar, 1996; Fedak & Hall, 2004; Mellor et al., 2009). O desenvolvimento tardio do carpo em alguns cetáceos pode ainda ocasionar a criação de um bloco cartilaginoso compacto que resulta em um pulso rígido com pouco ou nenhum movimento (Howell, 1930), fato não observado nos peixes-bois.

O desenvolvimento ósseo observado por meio de radiografias das epífises avaliadas é retardado no peixe-boi da Amazônia e todos os animais nascem sem nenhuma epífise presente. Tais estruturas aparecem somente após meses ou anos de vida e fusionam também tardiamente e em momentos alternados. As epífises proximais de ossos diferentes podem fusionar concomitantemente, contudo, epífises proximais e distais de um mesmo osso nunca fusionam juntas. Resultado diferente do encontrados em alguns cetáceos que fusionam as epífises metacarpais proximais e distais ao mesmo tempo (Calzada & Aguilar, 1996).

Apesar desse longo processo de ossificação, todos os seis ossos carpais, as epífises distais do rádio e ulna, assim como todas as epífises metacarpais e falangeais que se desenvolvem fusionam completamente. Diferentemente do que ocorre em algumas espécies de cetáceos como na Orca (*Orcinus orca*) que não possui nenhum osso carpal ossificado, os misticetos e alguns odontocetos da família

Phocoenidae que apresentam padrões pedomórficos de ossificação endocondral nos elementos carpais (Mellor et al., 2009). Nos peixes-bois, o fusionamento completo indica um término no crescimento longitudinal desses ossos e, possivelmente, observando o gráfico de crescimento, um término no crescimento de toda a nadadeira. Esta última afirmação, no entanto, não pôde ser corroborada por esse estudo devido ao fato das epífises do úmero e as proximais do rádio e ulna não estarem disponíveis para avaliação nas imagens dos animais mais velhos. Contudo, diversos autores relatam que o fusionamento das epífises nos mamíferos ocorre no sentido próximo-distal (Ogden et al., 1981; Calzada & Aguilar, 1996) e por isso as epífises avaliadas estariam fusionando após as estruturas no úmero e parte proximal do rádio e ulna.

A estimativa de fechamento total dessas epífises (maturidade óssea) em mais de 18 anos para fêmeas e mais de 20 anos para machos sinaliza que ela está ocorrendo bem após a maturidade sexual, que nas fêmeas está estimada entre seis e dez anos e nos machos entre cinco e dez anos. Em *Stenella coeruleoalba* (Cetacea) as fêmeas atingem a maturidade sexual aos 12 anos e a maturidade óssea das nadadeiras aos seis anos, enquanto machos atingem a maturidade sexual e óssea das nadadeiras ao mesmo tempo com cerca de 9 anos (Calzada & Aguilar, 1996). Estudos com *Phocoenoides dalli dalli* relatam que no momento que o rádio e ulna estão terminando seu fusionamento completo com as respectivas epífises o animal encontra-se sexualmente maduro (Ogden et al., 1981). Segundo Galatius et al. (2006) machos de golfinhos *Phocoena phocoena* cessam o desenvolvimento esquelético das nadadeiras com seis anos de idade, e retêm mais componentes pedomórficos do que as fêmeas da mesma espécie que continuam o desenvolvimento após os seis anos.

No entanto, considerando a maturidade sexual na espécie entre os seis e dez anos, percebe-se que todos os detalhes ósseos observados aparecem até o momento de maturidade sexual e o fusionamento das epífises proximais dos metacarpos coincide exatamente com esse período de puberdade e maturidade sexual. Assim, o fusionamento dessas epífises proximais metacarpais poderia funcionar como preditor da maturidade sexual enquanto o fusionamento das epífises

do rádio e ulna estaria relacionado ao comprimento assintótico para o peixe-boi da Amazônia.

Sabe-se que os hormônios sexuais atuam de forma positiva no desenvolvimento ósseo, acelerando o fechamento das epífises ósseas nas fêmeas de primatas (Greulich & Pyle, 1959; Hamada et al., 2003), principalmente após o desenvolvimento de uma gestação. A relação entre hormônios gonadais e hormônios somatotróficos é objeto de diversos estudos (Davis et al., 1977; Farhy et al., 2001; Guercio et al., 2003). Entre as fêmeas com histórico de vida conhecido utilizadas no presente estudo, somente duas haviam gestado e ambas apresentavam o desenvolvimento ósseo completo, porém o tempo de cativeiro era superior a 22 anos e não possuíam radiografias tiradas logo após o primeiro parto. No caso das fêmeas sem histórico de vida conhecido radiografadas que apresentavam o desenvolvimento ósseo completo, duas delas tinham fetos. Em resumo, a maioria dos animais estudados viveu ou ainda vive em condições de cativeiro em tanques separados por sexo onde cruzamentos não são possíveis, fato que poderia interferir no tempo de fechamento dessas estruturas nas fêmeas.

Questões nutricionais interferem no crescimento e densidade dos ossos, contudo, o tempo de fechamento das epífises é individualmente variável e independe de tais fatores alimentares. A ordem na qual tais eventos ocorrem independem tanto das questões nutricionais, quanto de questões reprodutivas ou genéticas e por isso constituem um parâmetro confiável de maturação. Um dos fatores que possivelmente corrobora com essa assertiva é o de que os animais utilizados no estudo são provenientes de locais diversos da bacia hidrográfica da Amazônia Brasileira, e independentemente disso se desenvolvem radiograficamente de maneira semelhante em cativeiro. Outro fator repousa na questão nutricional, os animais cativos radiografados no INPA e no CPPMA, locais que diferem na dieta oferecida, não desenvolveram de modo diferente, apesar de apresentarem tamanhos corporais lineares totais diferentes quando comparados (LMA & CPPMA, dados não publicados).

Quando comparados os métodos de avaliação visual e as regressões logísticas a ordem de aparecimento dos centros de ossificação variou entre machos e fêmeas. Visualmente não ocorreu diferença, enquanto estatisticamente

(Regressões logísticas) algumas estruturas apareceram em momentos diferentes. Tais resultados devem ser analisados com cautela porque as regressões logísticas utilizadas consideram uma probabilidade estatística e não uma definição exata do momento de ocorrência. Observou-se que existe uma variação individual não somente no tempo de desenvolvimento, mas também na ordem com que tais estruturas estão aparecendo radiograficamente.

Adicionalmente, observa-se que a diferença de tempo estimado por meio de regressões entre o aparecimento de estruturas em sequência é muito reduzida, variando entre inferior a 0.1 até 0.5 anos no máximo. Com uma exceção na epífise distal do metacarpo I, a qual leva mais de três anos para desenvolver após o aparecimento da penúltima estrutura analisada. Essa pequena janela de tempo torna difícil a percepção visual da ordem exata de ocorrência e, no entanto, a descrição visual nos resultados só variou na ordem de quatro estruturas: epífises proximais e distais do metacarpo V, epífise distal do metacarpo II e epífise proximal do metacarpo I. Além disso, como discutido acima, essa aparente diferença baseia-se em probabilidades e dentro de uma janela inferior a seis meses. Revelando que a observação visual pode sim ser usada como padrão para descrever o desenvolvimento ósseo nos peixes-bois e talvez responda corretamente também a ordem de fusão dessas estruturas, fatores que não puderam ser analisados estatisticamente por falta de animais suficientes apresentando tais características.

Várias estruturas apresentaram estatisticamente a mesma probabilidade de ocorrência em fêmeas: os carpos ulnar e intermédio; as epífises proximais dos metacarpos III e IV; o segundo carpo e as epífises proximais dos metacarpos II e V; e as epífises distais dos metacarpos III e IV. E nos machos: os carpos intermédio e radial; a epífise ulnar e o terceiro carpo; as epífises proximais dos metacarpos II, III e IV; o segundo carpo e as epífises distais dos metacarpos V e III; as epífises distais dos metacarpos IV e II; e o carpo radial e a epífise proximal do metacarpo I. Evidenciando novamente que algumas estruturas sequenciais desenvolvem-se praticamente juntas. Esse fato, aliado a ossificação endocondral tardia, embora possibilite a descrição do desenvolvimento ósseo, dificulta a tentativa de estimativa de idade nessa espécie por avaliação puramente visual de presença e ausência, pois os animais estão apresentando as mesmas estruturas rapidamente e, no

entanto, a evolução dos centros é demorada. Criando janelas muito grandes de tempo a partir dos três anos de idade.

Esse estudo examinou padrões morfológicos e taxas de ossificação do peixe-boi da Amazônia, um sirênio classificado como vulnerável, baseando-se na avaliação radiográfica das nadadeiras peitorais de indivíduos vivos e mortos. Comparado com outros sirênios, *Trichechus inunguis* possui os mesmo elementos carpais que *Trichechus manatus* (seis elementos) e um carpo a mais que *Dugong dugon*. A fórmula falangeal obtida foi 1-3-3-3-2/3 e apesar de possuírem um processo de ossificação endocondral demorado todas as epífises avaliadas fusionavam completamente com as respectivas diáfises.

O desenvolvimento em machos acontece de maneira mais tardia que as fêmeas, com todos os elementos avaliados estatisticamente iniciando seu aparecimento após o aparecimento nas fêmeas. A observação de que machos também estão atingindo a maturidade óssea completa das nadadeiras após as fêmeas indica que os processos de fusão devem estar ocorrendo após um tempo maior de vida em machos.

Conclui-se que a avaliação dos elementos carpais e grau de fusão das epífises dos metacarpos, falanges proximais e epífises distais do rádio e ulna são parâmetros mais confiáveis de avaliação da maturação óssea do que as epífises das falanges médias e distais. Contudo, a ocorrência de variações nas ordens exatas do aparecimento das estruturas, e nos tempos de maturação individuais dificulta o estabelecimento da “norma” padrão de desenvolvimento da espécie. Trata-se de uma espécie cuja completa maturação óssea das nadadeiras ocorre tardiamente (com mais de 20 anos em machos e a partir de 18 anos nas fêmeas) e um número maior de indivíduos mais velhos deve ser estudado.

## 5. Referências Bibliográficas

Albuquerque Jr., D.P. 2003. *Descrição Histológica do tecido ósseo do domo timpânico, estimativa de idade e crescimento do peixe-boi da Amazônia Trichechus inunguis (Natterer, 1883) Mammalia, Sirenia*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, Amazonas. 100pp.

Amaral, R. S.; da Silva, V. M. F.; Rosas, F.C.W. 2010. Body weight/length relationship and mass estimation using morphometric measurements in Amazonian manatees *Trichechus inunguis* (Mammalia: Sirenia). *Marine Biodiversity Records*, 3(105): 1-4.

Bazzini, M.D.; Reynolds III, J.E.; Essman, R.A. 1986. Erythropoiesis and granulopoiesis in the West Indian manatee, *Trichechus manatus* (Mammalia: Sirenia). *Acta Anatomica*, 126: 150-152.

Beatty, .L.; Vitkovski, T.; Lamert, O.; Macrini, T.E. 2012. Osteological associations with unique tooth development in manatees (*Trichechus*, Sirenia): A Detailed look at modern *Trichechus* and a review of the fossil record. *The anatomical Record*, 295(9): 1504-1512.

Bontrager, K.L. 2003. *Tratado de técnica radiológica e base anatômica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, BR. 840pp.

Britt Jr., J.O.; Howard, E.B. 1983. The hematopoietic system. In: Howard, E.B. (Ed). *The Pathobiology of marine mammal diseases*. Vol. 2. Saunders, Philadelphia. p. 65-78.

Butti, C.; Corain, L.; Cozzi, B.; Podesta, M.; Pirone, A.; Affronte, M.; Zotti, A. 2007. Age estimation in the Mediterranean bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu 1821) by bone density of the thoracic limb. *Journal of Anatomy*, 211: 639-646.

Calzada, N.; Aguilar, A. 1996. Flipper development in the Mediterranean Striped dolphin (*Stenella Coeruleoalba*). *The Anatomical Record*, 245: 708-714.

Colares, F.A.P. 2002. *Estudo de modelos não lineares de crescimento em peixe-boi marinho *Trichechus manatus manatus* e peixe-boi Amazônico *Trichechus inunguis* (Mammalia: Sirenia) em cativeiro*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Cooper, L.N. 2008. Forelimb Anatomy. In: Perrin, W.F.; Würsig, B.; Thewissen, J.G.M. (Eds). *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press, California, CA, USA. p. 449-452.

Cooper, L.N.; Dawson, S.D. 2009. The trouble with flippers: a report on the prevalence of digital anomalies in Cetacea. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 155: 722-735.

Danil, K.; Robertson, K.M.; Chivers, S.J. 2004. *An evaluation of using enhanced digital microscopy to estimate ages of short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*)*. NOAA Technical Memorandum NMFS. National Marine Fisheries Service, NOAA, La Jolla, CA, USA. 32pp.

Davis, S.L.; Ohlson, D.L.; Klindt, J.; Anfinson, M.S. 1977. Episodic growth hormone secretory patterns in sheep: relationship to gonadal steroid hormones. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 233(6): E519-523.

- Dawson, S.D. 2003. Patterns of ossification in the manus of the harbor porpoise (*Phocoena phocoena*): Hyperphalangy and delta-shaped bones. *Journal of Morphology*, 258: 200-206.
- Domning, D.P.; Bufrénil, V. 1991. Hydrostasis in the sirenia: Quantitative data and functional interpretations. *Marine Mammal Science*, 7(4): 331-361.
- Domning, D.P.; Hayek, L.A.C. 1984. Horizontal tooth replacement in the Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*). *Mammalia*, 48:105–127.
- Eklöf, O. Ringertz, H. 1967. A method for assessment of skeletal maturity. *Annals of Radiology*, 10(3-4): 330-336.
- Farhy, L.S.; Straume, M.; Johnson, M.L.; Kovatchev, B.; Veldhuis, J.D. 2001. A construct of interactive feedback control of the GH axis in the male. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 281: R38–R51.
- Fawcett, D.W. 1942. The amedullary bones of the Florida manatee (*Trichechus latirostris*). *American Journal of Anatomy*, 71(2): 271-309.
- Fedak, T.J.; Hall, B.K. 2004. Perspectives on hyperphalangy: Patterns and processes. *Journal of Anatomy*. 204: 151-163.
- Galatius, A.; Andersen, M-B. E.R.; Haugan, B.; Langhoff, H.E.; Jespersen, A. 2006. Timing of epiphyseal development in the flipper skeleton of the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) as an indicator of paedomorphosis. *Acta Zoologica, Stockholm*, 87: 77-82.
- Gheerbrant, E.; Domning, D.P.; Tassy, P. 2005. Paenungulata (Sirenia, Proboscidea, Hyracoidea, and relatives). In: Rose, K.D.; Archibald, J.D. *The rise of placental mammals: Origins and relationships of the major extant clades*. The Johns Hopkins University Press. Ed. 1. 280p.
- Gühr, M.; Kraus, C.; Pilleri, G. 1982. The manus of *Pseudorca crassidens* (Owen): A study of variability. *Investigations on Cetacea*. 23: 101-124.
- Gray, N-M.; Kainec, K.; Madar, S.; Tomko, L.; Wolfe, S. 2007. Sink or Swim? Bone Density as a Mechanism for Buoyancy Control in Early Cetaceans. *The Anatomical Record*, 290: 638-653.
- Greulich, W.W.; Pyle, S.I. 1959. *Radiographic Atlas of Skeletal Development of the Hand and Wrist*. Stanford University Press, Palo Alto, CA, USA. 256pp.
- Guercio, G.; Rivarola, M.A.; Chaler, E.; Maceiras, M.; Belgorosky, A. 2003. Relationship between the growth Hormone/Insulin-like Growth Factor-I Axis, Insulin sensitivity, and Adrenal Androgens in normal prepubertal and pubertal girls. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 88(3): 1389-1393.



Guglielmini, C.; Zotti, A.; Bernardini, D.; Pietra, M.; Podestá, M.; Cozzi, B. 2002. Bone density of the arm and forearm as an age indicator in specimens of stranded striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *The Anatomical Record*, 267: 225-230.

Hamada, Y.; Chatani, K.; Udono, T.; Kikuchi, Y.; Gunji, H. 2003. A longitudinal study on hand and wrist skeletal maturation in chimpanzees (*Pan troglodytes*), with emphasis on growth in linear dimensions. *Primates*, 44: 259-271.

Harper, J.Y.; Samuelson, D.A.; Reep, R.I. 2005. Corneal vascularization in the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) and three-dimensional reconstruction of vessels. *Veterinary Ophthalmology*, 8: 89-99.

Hautier, L.; Stansfield, F.J.; Allen, W.R.T.; Asher, R.J. 2012. Skeletal development in the African elephant and ossification timing in placental mammals. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*. 279: 2188–2195.

Howell, A.B. 1930. *Aquatic mammals: Their Adaptations to life in water*. Springfield, IL: Charles C. Thomas. 338 pp.

Hughes, P.C.R.; Tanner, J.M. 1970. The assessment of skeletal maturity in the growing rat. *Journal of Anatomy*, 106(2): 371-402.

Hughes, P.C.R.; Tanner, J.M. 1973. A radiographic study of the growth of the rat pelvis. *Journal of Anatomy*, 114(3): 439-448.

Hui, C.A. 1979. Correlates of maturity in the common dolphin, *Delphinus delphis*. *Fishery Bulletin*, 77: 295-300.

Husar, S.L. 1977. *Trichechus inunguis*. *Mammalian species*, 72: 1-4.

Ito, H.; Miyazaki, N. 1990. Skeletal development of the striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) in Japanese Waters. *Journal of Mammal Society of Japan*, 14: 79-96.

Junqueira, L.C.; Carneiro, J. 2004. Hemocitopoese. In: Junqueira, L.C; Carneiro, J. (Eds). *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, SA. Ed. 10. 488p.

Kaiser, H.E. 1974. *Morphology of the Sirenia*. S. Karger. Basel, Switzerland.

Karaplis, A.C. 2008. Embryonic Development of Bone and regulation of intramembranous and endochondral bone formation. In: Bilezikian, J.P.; Raisz, L.G.; Martin, T.J. (Eds). *Principles of Bone Biology*. Vol.1. Academic Press. San Diego, CA, USA. p. 53-84.

König, H.E.; Liebich, H-G. 2011. *Anatomia dos Animais Domésticos: Texto e Atlas*. Porto Alegre: Artmed, Ed. 4. 788p.

Marks, S.A.; Erickson, A.W. 1966. Age determination in the black bear. *Journal of Wildlife Management*, 30: 389.

- Mellor, L.; Cooper, L.N.; Torre, J.; Brownell Jr, R.L. 2009. Paedomorphic ossification in porpoises with an emphasis on the vaquita (*Phocoena sinus*). *Aquatic Mammals*, 35(2): 193-202.
- Odell, D.K. 1982. The West Indian manatee *Trichechus manatus*. In: Chapman & Feldhammer (Eds). *Wild mammals of North America biology, management and economics*. Hopkins University Press. pp. 828-837.
- Ogden, J.A.; Conlogue, G.J.; Rhodin, A.G.J. 1981. Roentgenographic indicators of skeletal maturity in marine mammals (Cetacea). *Skeletal Radiology*, 7: 119-123.
- Quiring, D.P.; Harlan, C.F., 1953. On the anatomy of the manatee. *Journal of Mammalogy*, 34: 192-203.
- Rommel, A.; Lowenstine, L. 2001. Gross and microscopic anatomy. In: Dicrauf, L.A.; Gulland, F.M.D. (Eds). *CRC Handbook of marine mammal medicine: Health, disease, and rehabilitation*. CRC Press, Florida. 2 ed.
- Rosas, F.C.W. 1994. Biology, conservation and status of the Amazonian Manatee *Trichechus inunguis*. *Mammal Review*, 24: 49-59.
- Smith, R.N.; Allock, J. 1960. Epiphyseal fusion in the grey-hound. *Veterinary Records*, 72: 75.
- Tanner, J.M.; Whitehouse, R.H. 1959. *Standarts for skeletal maturation*. Paris: international Children`s Center.
- Vergara-Parente, J.E.; Parente, C.L.; Marmontel, M.; Silva, J.C.R.; Sá, F.B. 2010. Growth curve of free-ranging *Trichechus inunguis*. *Biota Neotropica*, 10(3): 89-92.
- Wall, W.P. 1983. The Correlation between High Limb-Bone Density and Aquatic Habits in Recent Mammals. *Journal of Paleontology*, 57(2): 197-207.
- Windgate, T.; Todd, A.W. 1938. The epiphyseal union pattern of the ungulates with note on Sirenia. *American Journal of Anatomy*, 63(1): 1-36.

*Uso de Métodos Radiográficos e  
Ultrassonográficos para Estimativas de  
Idade em Peixe-boi da Amazônia.*

Brum, W.M.; Da Silva, V.M.F. 2013

Manuscrito formatado para *Acta Amazonica*

---

## Resumo

A determinação da idade cronológica dos indivíduos é um parâmetro simples, porém extremamente necessário em estudos biológicos populacionais. Ela provê a base para o desenvolvimento de tabelas estruturais, cálculo de taxas de crescimento e análise de viabilidade de populações animais selvagens. Até a presente data, nenhum estudo acerca da estimativa de idade em indivíduos vivos de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) por métodos usuais de diagnóstico por imagem foi efetuado. Trata-se de uma espécie de mamífero aquático endêmica da bacia Amazônica, a qual se encontra classificada como vulnerável segundo a legislação brasileira e internacional. O objetivo desse trabalho foi desenvolver métodos confiáveis de estimativa de idade em indivíduos vivos de *T. inunguis*, adaptando métodos consagrados utilizados em medicina humana por meio da análise de radiografias carpais e exames diagnósticos de ultrassom. Durante os anos de 2011 e 2012, os animais cativos em dois centros de pesquisa no estado do Amazonas, Brasil, foram submetidos a estudos radiográficos e ultrassonográficos das nadadeiras peitorais para obtenção de dados padrão idade-específicos. A metodologia utilizada baseou-se nos métodos de Greulich-Pyle, Eklof-Ringertz e Tanner-Whitehouse, mundialmente reconhecidos e amplamente utilizados para avaliação de desenvolvimento ósseo em humanos. A avaliação ultrassonográfica não gerou resultados satisfatórios, contudo, por meio da avaliação de radiografias foram criados dois Atlas de desenvolvimento ósseo das nadadeiras peitorais para a espécie, tabelas de Índices de Maturidade Óssea e tabelas com medidas-padrão de comprimento de seis elementos ósseos separadas por sexo e classes de tempo. Como a espécie apresenta um desenvolvimento ósseo muito lento, as janelas de tempo obtidas não tiveram a precisão desejada (janelas de três anos ou mais), contudo as imagens obtidas representam importante informação cronológica para a espécie. Conclui-se que o desenvolvimento ósseo em peixe-boi da Amazônia pode ser acompanhado por meio da avaliação radiográfica, porém mais estudos devem ser realizados com o intuito de diminuir a janela de tempo obtida pelo presente trabalho e aumentar a precisão da estimativa de idade para a espécie.

*Palavras-chave:* Diagnóstico por imagem, sirênios, desenvolvimento carpal

## 1. Introdução

Descoberto em 1895, pelo engenheiro mecânico alemão Wilhelm Conrad Röntger, os raios-x revolucionaram o mundo da medicina e foram imediatamente reconhecidos como uma extraordinária descoberta científica. A primeira radiografia diagnóstica foi realizada em fevereiro de 1896 em Dartmouth, nos Estados Unidos, e o primeiro aparelho de raios-X chegou ao Brasil em 1897, na cidade de Formiga, Minas Gerais (Francisco et al., 2005). Nascia então, o campo da radiologia (parte da ciência que estuda órgãos ou estruturas por meio de imagens obtidas com o uso de radiações). Nas últimas décadas novos métodos de diagnósticos por imagem foram desenvolvidos, tais como a ultrassonografia, a ressonância magnética nuclear e a tomografia computadorizada. Contudo, a radiografia convencional ou digital permanece até hoje como importante ferramenta diagnóstica (Brant, 2007).

O uso de métodos radiográficos para a determinação da maturação óssea e idade cronológica dos indivíduos remonta os anos de 1937, e desde então diversos métodos e atlas focando diferentes partes do esqueleto humano têm sido propostos. Entre esses métodos podemos destacar os trabalhos de: Greulich e Pyle (1959), Eklof e Ringertz (1967) e o de Tanner e Whitehouse (1959) (Haiter Neto et al., 2000). Esses autores focaram seus estudos na observação do desenvolvimento ósseo da região da mão e punho (desenvolvimento carpal), principalmente porque esta estrutura apresenta vários centros de ossificação visíveis, facilidade de obtenção da imagem e alta relação custo x benefício (Greulich & Pyle, 1959; Tanner & Whitehouse, 1959; Eklof & Ringertz, 1967; Haiter Neto et al., 2000).

A ultrassonografia apresenta como vantagem em relação aos métodos radiográficos convencionais e digitais o fato de não ser baseada na utilização de raios-x, os quais são comprovadamente nocivos às células em determinadas concentrações (Drost, 2002; Francisco et al., 2005). Células em processos de divisão constantes são particularmente sensíveis à exposição de raios-x (Sinclair, 2012), e por isso, a ultrassonografia é um método diagnóstico não invasivo útil no

acompanhamento do desenvolvimento embrionário em humanos e animais (Kähn, 1992; Shah et al., 2010; Khade et al., 2011). Diversos trabalhos sobre a estimativa de idade e desenvolvimento fetal foram realizados na medicina humana e veterinária, aliando tamanho, morfologia e presença/ausência de determinadas estruturas com o tempo de concepção/gestação de determinada espécie (Kähn, 1992; Lacave et al., 2004; Shah et al., 2010; Khade et al., 2011; Wu et al., 2012; Pereira et al., 2013;). Métodos ultrassonográficos métricos e visuais, alguns inclusive baseados nos métodos de Greulich e Pyle, são atualmente utilizados na estimativa de idade de crianças (Bilgili et al., 2003; Mentzel et al., 2005).

O peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) é uma espécie ameaçada, endêmica dos rios da Amazônia e listada como vulnerável no território nacional (Da Silva et al., 2008; IUCN, 2010). Encontra-se distribuído por toda a bacia amazônica, sendo alvo de caça ilegal ainda nos dias atuais (Rosas & Pimentel, 2001). Os caçadores têm como alvo os animais adultos, gerando órfãos incapazes de sobreviverem sozinhos, alguns dos quais têm sido reabilitados no Parque Aquático Robin Best em Manaus-AM (Domning, 2012) e o Centro de Proteção e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos em Presidente Figueiredo-AM.

Embora o peixe-boi da Amazônia tenha sido intensamente estudado, alguns aspectos da biologia da espécie permanecem desconhecidos e parâmetros como a idade cronológica dos indivíduos constituem ferramentas importantes na compreensão da história de vida desses animais (Danil et al., 2004). Estimativas de idade em animais aquáticos têm se baseado na contagem de camadas de crescimento presente em dentes (Marsh, 1980; Marmontel et al., 1996; Stewart et al., 1996; Santos et al., 2003) ou estruturas ósseas como o domo da bula timpânica (Marmontel et al., 1996; Albuquerque Júnior, 2003; Vergara-Parente, 2009) e costelas (Maciel & da Silva, 2009). Outros estudos avaliam o grau de fusão dos ossos do crânio (Roston et al., 2013). Esses métodos apresentam excelente grau de precisão, contudo, ou só podem ser realizados em animais mortos (contagem em estruturas ósseas) ou são altamente invasivos se realizados em animais vivos (retirada de dentes). Os métodos radiográficos e ultrassonográficos não apresentam tais problemas, e vários trabalhos foram realizados utilizando-se dessas tecnologias em mamíferos diversos como cetáceos (Calzada & Aguilar, 1996; Gluglielmini et al.,

2002; Lacave et al., 2004; Mellor et al., 2009;), roedores (Hughes & Tanner, 1970; Hughes & Tanner, 1973), primatas (Hamada et al., 2003; Mentzel et al., 2005), ruminantes (Airina et al., 2011; Rihab et al., 2012) e marsupiais (Delaney & Marsh, 1995).

Especificamente em relação aos peixes-bois, a contagem das camadas de crescimento (“Growth layer groups” ou “GLGs” em inglês) em dentes não constitui parâmetro confiável porque esses animais são polifiodontes, trocando os dentes ao longo de toda a vida (Domning & Hayek, 1984; Beatty et al., 2012). Diferentemente dos peixes-bois, os dugongos possuem dentes incisivos permanentes que eclodem e se desgastam nos machos e permanecem não eclodidos nas fêmeas jovens, eclodindo em algumas fêmeas mais velhas. Com base nessas estruturas Marsh (1980) estimou com sucesso a idade nesses animais.

Este trabalho constitui a primeira tentativa de adaptar métodos consagrados na medicina humana (como os de Greulich e Pyle, Tanner e Whitehouse e Eklof e Ringertz) para estimar idade em sirênios. Incluindo o uso de imagens ultrassonográficas.

## **2. Métodos**

### **2.1 Técnicas Radiográficas**

#### **2.1.1 Método Greulich e Pyle visual (GP)**

Esse método consiste em uma avaliação puramente visual na qual se observa a radiografia como um todo, comparando-a com uma imagem padrão. Como não existem imagens padrão para as nadadeiras peitorais do peixe-boi da Amazônia, a avaliação dos centros de ossificação gerou um atlas a partir da fotografia e escaneamento das radiografias agrupadas por tempo de cativeiro.

Somente animais de histórico conhecido foram utilizados na avaliação e, entre as imagens analisadas, escolheu-se aquela que apresentava maior incidência de aparecimento de centros de ossificação secundários em comum, ou seja, aquela

cujo número de centros observados simbolizava as estruturas mais prevalentes no grupo.

A estimativa de idade foi obtida pela inspeção de 31 centros de ossificação, adaptados para a anatomia de *T. inunguis*, ilustrados na fig. 08. As imagens padrão foram selecionadas baseando-se nos critérios descritos acima na secção de métodos gerais: “Seleção geral de imagens”, item 3.4 e divididas por sexo.

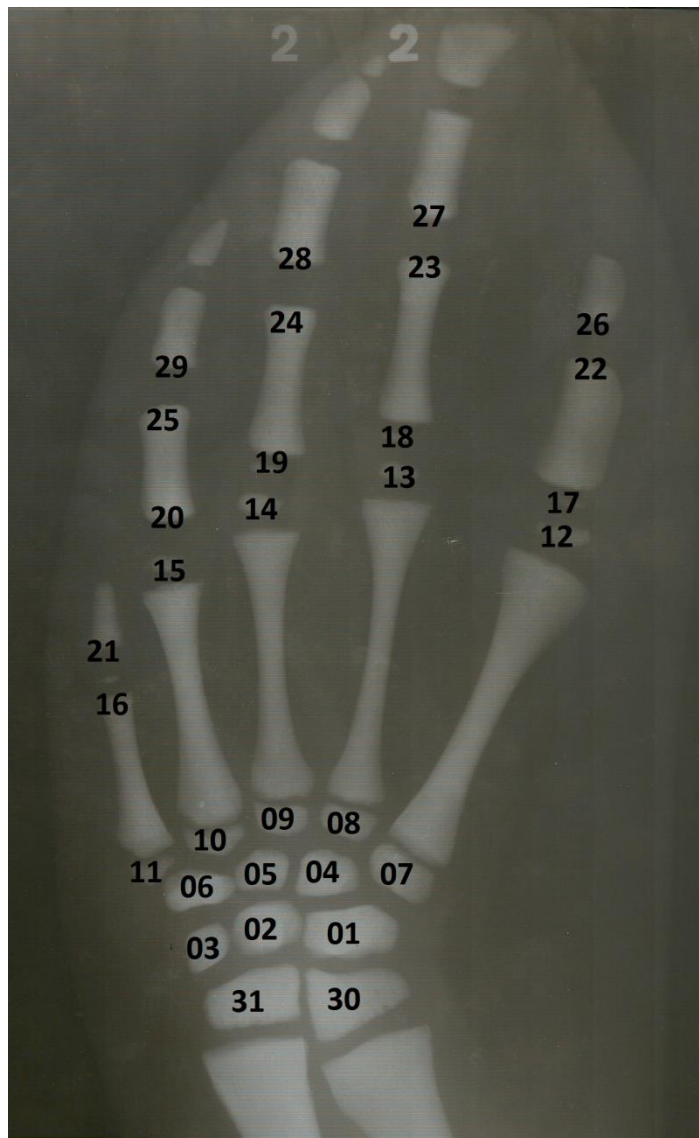


Figura 8. Representação dos 31 centros de ossificação observados na nadadeira peitoral de *T. inunguis*, numerados de maneira aleatória.



### **2.1.2 Método Tanner e Whitehouse (TW)**

Nesse método os estágios de maturação são classificados para cada um dos ossos avaliados, atribuindo um escore com peso específico para cada osso e sexo, cuja soma dos escores fornece a idade óssea. Em humanos são avaliados 20 ossos (rádio, ulna, sete ossos carpais, três metacarpos e oito falanges), para *T. inunguis*, no entanto, só existem seis ossos carpais, tornando possível a avaliação máxima de 25 ossos. A avaliação nos humanos segue a seguinte ordem: rádio, ulna, metacarpais I, II e V; falanges proximais I, II e V; falanges médias III e V; falanges distais I, III e V; e ossos carpais.

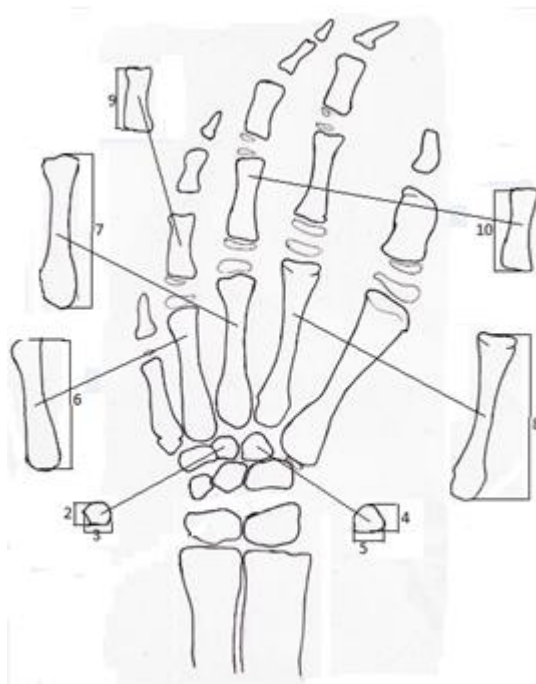
Considerando os resultados descritos no capítulo 1, no qual se concluiu que a observação das falanges distais não constitui um bom parâmetro de desenvolvimento para a espécie, optou-se por excluir tais ossos da análise. A avaliação focou-se então na observação dos elementos carpais, epífises distais do rádio e ulna, todas as epífises dos metacarpos I, II, III, IV e V, todas as epífises das falanges proximais, e epífises proximais e distais das falanges médias II, III, IV e V.

Os animais de histórico desconhecido ou que foram resgatados com idade cronológica mais avançada (Tabela 03 “número de animais utilizados sem histórico” apresentada na seção “Métodos Gerais”) foram excluídos da análise. O índice de maturação proposto levou em consideração o tempo de cativeiro desses animais.

### **2.1.3 Método Eklöf e Ringertz (ER)**

Método no qual a idade óssea é avaliada por meio de medidas de comprimento e largura dos centros de ossificação (Olivete Junior, 2005). Para estimativa da idade óssea pelo índice ER foram observados os seguintes parâmetros: comprimento e largura dos ossos do carpo; comprimento dos metacarpos e comprimento das falanges proximais, médias e distais (Fig. 09). Com isso, o maior número de parâmetros possível de ser obtido por indivíduo foi igual a 30 em animais que apresentavam todos os ossos carpais desenvolvidos e a presença de uma quinta falange distal (fórmula falangeana individual de 1-3-3-3-3).

Os animais de histórico desconhecido e chegada aos tanques em desenvolvimento corporal avançado foram excluídos da análise. As radiografias realizadas por meio de aparelho de raios-X digital também foram excluídas porque não foi possível calibrá-las com a escala correta. Admite-se que essas imagens sofreram aumento devido a maiores distância objeto-filme, e como não possuíam objetos com dimensões conhecidas para calibragem, foram desconsideradas.



**Figura 9.** Centros de ossificação utilizados pelo método de Eklöf & Ringertz. 2 e 4- comprimento dos ossos do carpo, 3 e 5- largura dos ossos do carpo, 6, 7 e 8- comprimento dos metacarpos, 9 e 10- comprimento das falanges.

As radiografias restantes foram escaneadas, calibradas e medidas com o auxílio do programa Image-pro Express versão 4.5.1.3 para Windows. Medidas de comprimento foram obtidas por meio da distância linear entre dois pontos marcados no centro das extremidades proximal e distal dos carpos (Fig. 09, números 2 e 4) e no centro das extremidades distais das epífises distais e extremidades proximais das epífises proximais dos metacarpos e falanges (Fig. 09, números 6,7,8,9 e 10). Medidas de largura foram obtidas pela distância linear entre dois pontos centrais marcados nas faces lateral e medial dos ossos do carpo (Fig. 09, números 3 e 5).

Todas as medidas foram comparadas estatisticamente com o tempo de cativeiro por meio de correlação canônica. Baseado nesse resultado seis medidas foram escolhidas para compor a tabela de medidas padrão.

## **2.2 Técnicas Ultrassonográficas**

O exame ultrassonográfico foi realizado utilizando o aparelho Sonosite probe convexa e frequência de 10-5 MHz. Dois observadores foram utilizados, um experiente e um inexperiente, para obtenção das imagens. O objetivo foi obter as medidas de comprimento dos ossos do metacarpo, carpo e falanges adaptando metodologia de ER. As imagens foram devidamente identificadas, fotografadas e armazenadas digitalmente.

Inicialmente, a meta foi realizar as dez medidas-padrão propostas por Eklof e Ringertz e, quando não possível, realizar prioritariamente medidas dos metacarpais II e IV e a terceira falange. Olivete Junior (2005) realizou com sucesso uma simplificação deste método, concluindo que é possível estimar com confiança a idade óssea baseando-se apenas nas medidas supracitadas, excluindo da análise os ossos do carpo e do punho.

Os exames foram realizados diretamente nos tanques, os indivíduos foram contidos manualmente, mantidos à sombra e observados quanto a manifestações de estresse.

## **3. Resultados**

### **3.1 Índice de Maturação óssea (IM)**

Após observação das imagens radiográficas foi proposto um Índice de maturação óssea (IM) semelhante ao método de Tanner e Whitehouse considerando-se as epífises distais do rádio e ulna, os ossos do carpo, metacarpos e falanges (todas as falanges proximais e as falanges médias dos dígitos II, III e IV). As epífises distais da falange do primeiro dígito foram desconsideradas, assim como

todas as epífises distais das falanges médias. Isso ocorreu porque, no primeiro caso, a epífise encontra-se ausente e, no segundo caso, porque apresentam um aparecimento esporádico e não seguem o padrão descrito (item 3.1.5 “falanges”). Essas estruturas, quando presentes, iniciavam a fusão com as metáfises quando ainda possuíam um formato circular reduzido.

Os escores máximos de cada osso são discutidos abaixo junto com desenhos esquemáticos de cada estágio de maturação. Todos os centros secundários de ossificação avaliados possuem o mesmo peso, ou seja, o valor do IM é obtido por meio da soma dos escores ósseos individuais. O maior valor possível para IM (indivíduo com maturação óssea completa) é 85 e o menor é zero.

A descrição dos estágios foi feita da maneira mais simples possível e os ossos foram separados em poucos estágios (máximo de três, iniciando por zero e totalizando até quatro estágios) para evitar dúvidas na aplicação do método. As ilustrações contidas abaixo de cada um dos itens seguintes (índices dos ossos) demonstram as variações ao longo de um único estágio (mais de um desenho por estágio) e as diferenças entre estágios.

### **3.1.1 Índice radial - IR (Fig. 10)**

A evolução da epífise distal do rádio foi classificada em três estágios descritos abaixo:

*Estágio 0.* A epífise distal do rádio não se encontra visível ou aparece como um simples traço ou ponto radiopaco sem forma definida.

*Estágio 1.* A epífise distal já possui uma forma clara e bem definida (retangular ou circular), sua largura varia desde menor que a metáfise até do mesmo tamanho que a mesma.

*Estágio 2.* A união da epífise com a diáfise inicia-se, sua largura é um pouco maior ou do mesmo tamanho que a metáfise. Uma linha distinta se forma no ponto de fusão entre os elementos ósseos e evolui até o momento completo de fusão.

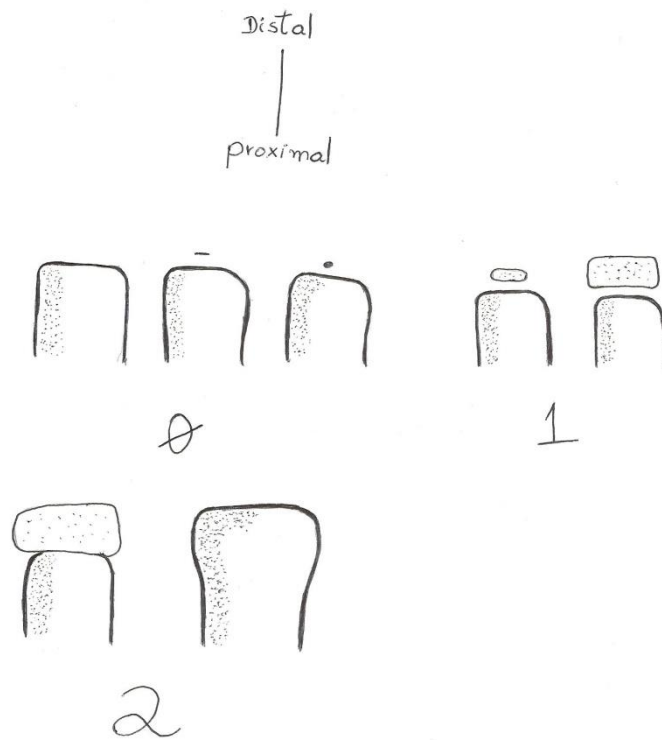


Figura 10. Índice radial. Ilustração dos estágios 0 a 2.

### 3.1.2 Índice ulnar - IU (Fig. 11)

A evolução da epífise distal da ulna foi classificada em três estágios descritos abaixo:

*Estágio 0.* A epífise distal da Ulna não se encontra visível ou aparece como um simples traço ou ponto radiopaco sem forma definida.

*Estágio 1.* A epífise distal já possui uma forma clara e bem definida (retangular ou circular), sua largura varia desde menor que a metáfise até do mesmo tamanho que a mesma.

*Estágio 2.* A união da epífise com a metáfise inicia-se, sua largura é um pouco maior ou do mesmo tamanho que a metáfise; Uma linha distinta se forma no ponto de fusão entre os elementos ósseos e evolui até o momento completo de fusão.

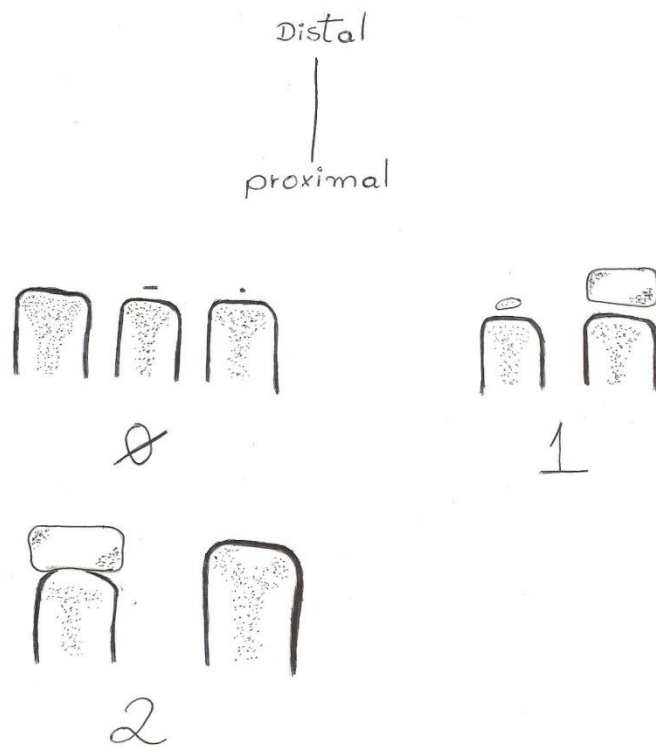


Figura 11. Índice ulnar. Ilustração dos estágios 0 a 2.

### 3.1.3 Índice carpal - IC (Fig. 12)

As evoluções dos centros de ossificação dos ossos do carpo foram classificadas em dois estágios descritos abaixo:

Estágio 0. O centro secundário de ossificação está ausente ou aparece na forma de uma linha, borrão ou ponto sem uma forma definida.

Estágio 1. O centro possui uma forma definida geralmente circular ou quadrada e aumenta gradativamente em comprimento e largura até sua forma final.

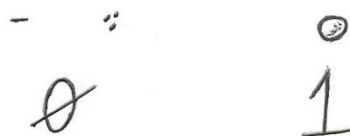


Figura 12. Índice carpal. Ilustração dos estágios 0 a 1.

### 3.1.4 Índice metacarpal - IMC (Fig.13)

As evoluções das epífises proximais e distais dos metacarpos foram classificadas em quatro estágios descritos abaixo:

Estágio 0. Não é possível visualizar a epífise, ou a mesma se encontra na forma de um traço ou ponto.

Estágio 1. A epífise é visível e apresenta formato bem definido circular ou retangular com a largura menor do que a metáfise.

Estágio 2. A epífise possui a mesma largura que a metáfise ou uma largura maior; As bordas da epífise podem começar a envolver a metáfise óssea, circundando as bordas laterais da mesma e/ou podem possuir um ponto de início de fusão. Porém um dos lados da epífise permanece livre.

Estágio 3. Toda a extensão da epífise encontra-se em contato com as bordas da metáfise, permanecendo uma linha mais radiopaca ao longo das superfícies de união; A epífise completa sua fusão e não é possível distinguir entre a epífise e a metáfise óssea.

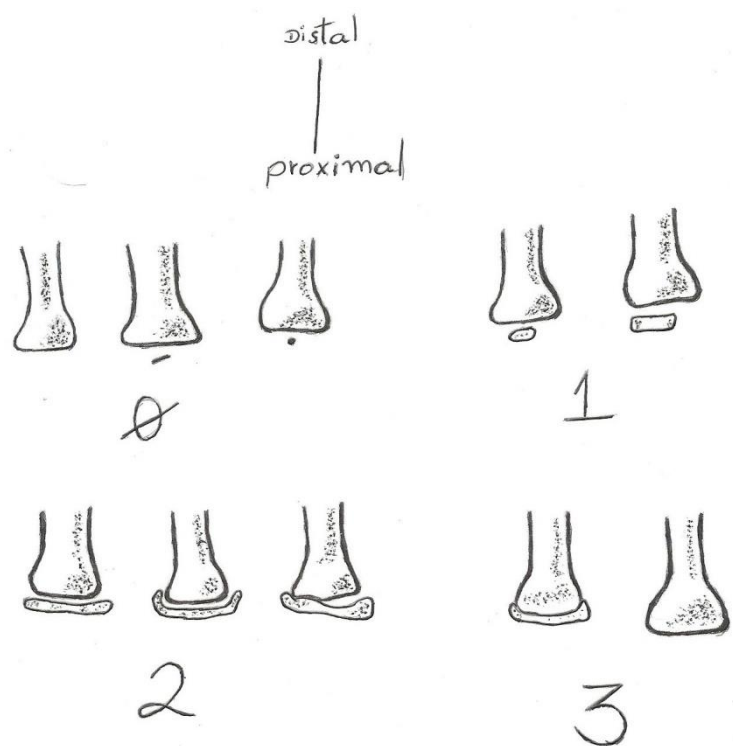


Figura 13. Índice metacarpal. Ilustração dos estágios 0 a 3.

### 3.1.5 Índice falangeal – IFP e IFM (Fig. 14)

As epífises avaliadas nas falanges incluem: epífises proximais de todas as falanges proximais; epífises distais da segunda, terceira, quarta e quinta falanges proximais; epífises proximais e distais da segunda, terceira e quarta falanges médias. A evolução de cada uma dessas estruturas foi classificada em quatro estágios descritos abaixo:

Estágio 0. Não é possível visualizar a epífise, ou a mesma se encontra na forma de um traço ou ponto.

Estágio 1. A epífise é visível e apresenta formato bem definido circular ou retangular com a largura menor, maior ou igual à metáfise.

Estágio 2. A epífise possui um ponto de início de fusão. Porém um ou ambos os lados da epífise permanecem livres.

Estágio 3. Toda a extensão da epífise encontra-se em contato com as bordas da metáfise, permanecendo uma linha mais radiopaca ao longo das superfícies de união; A epífise completa sua fusão e não é possível distinguir entre a epífise e a metáfise óssea.

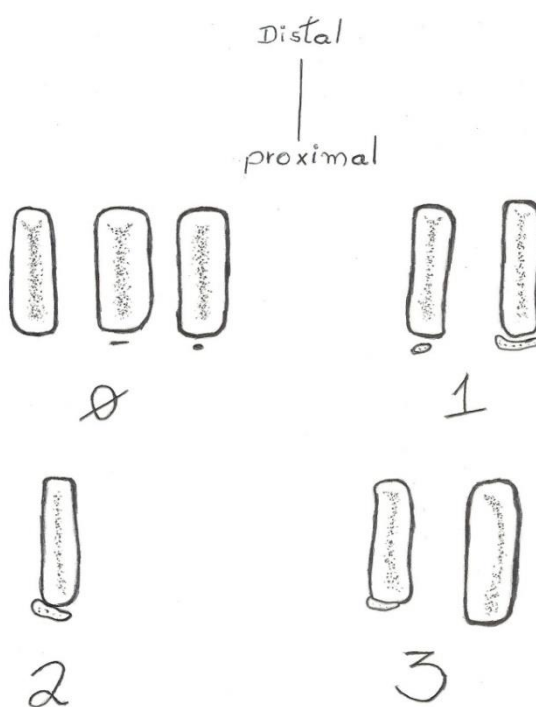


Figura 14. Índice falangeal. Ilustração dos estágios 0 a 3



O valor de cada estágio individual é igual ao número correspondente ao mesmo. Exemplo: estágio 0 = valor 0 pontos; estágio 2 = valor 2.0 pontos. A figura 10 (letras A e B) abaixo ilustra o cálculo realizado seguindo a seguinte fórmula:

$$IM = IR + IU + IC + IMC + IFP + IFM$$

Onde: IM (índice de maturação óssea); IR (índice radial); IU (índice ulnar); IC (índice carpal); IMC (índice metacarpal); IFP (índice das falanges proximais); e IFM (índice das falanges médias).

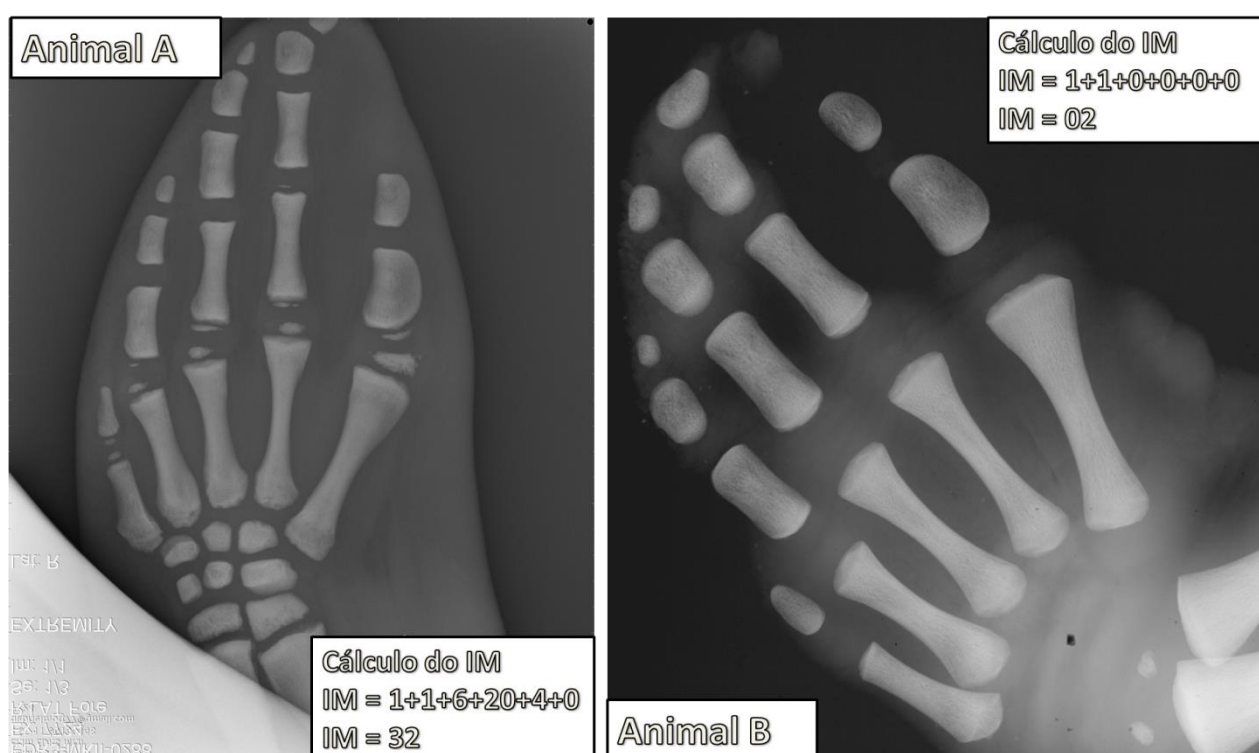


Figura 15. Radiografias digitais das nadadeiras peitorais de dois peixes-bois da Amazônia machos com Índice de maturação óssea calculado segundo fórmula:  $IM = IR + IU + IC + IMC + IFP + IFD$ . Animal A com nove anos de cativeiro e o animal B com um mês de cativeiro.

### 3.2 Resultados dos métodos Radiográficos

#### 3.2.1 Resultados do Método Greulich e Pyle visual (GP)

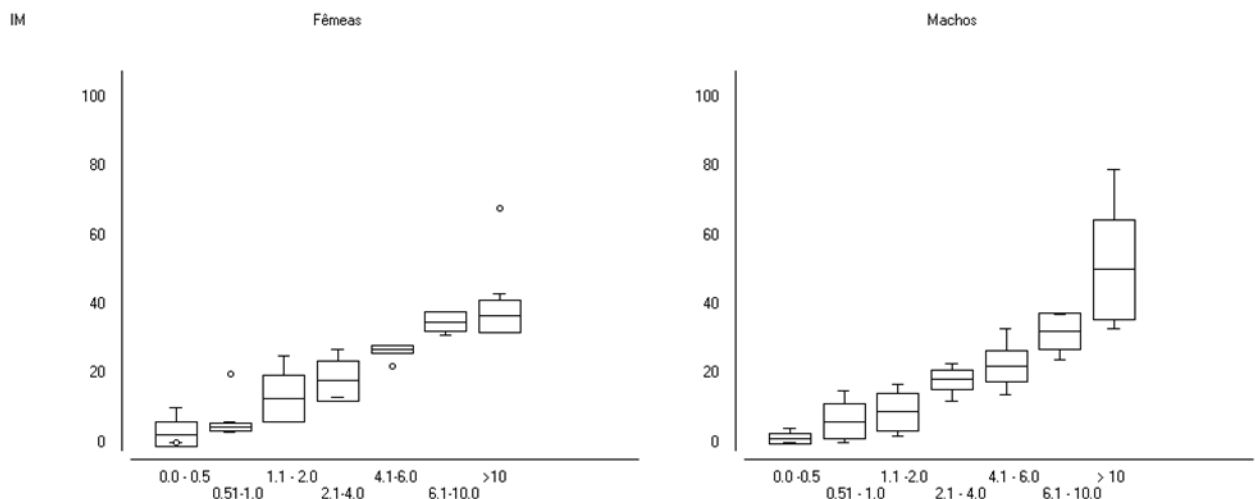
O atlas de desenvolvimento ósseo das nadadeiras peitorais para fêmeas e machos do peixe-boi da Amazônia macho e fêmea está apresentado nos anexos III

e IV, respectivamente. A escolha das imagens baseou-se na qualidade e representatividade de determinado estágio de tempo. Não foram observados eventos marcantes e sim um aparecimento contínuo culminando com a fusão das estruturas já descritas no capítulo I.

Os machos desenvolvem as epífises antes das fêmeas, contudo demoram mais tempo para a fusão completa dessas estruturas. A ausência de imagens intermediárias entre os tempos descritos deve-se ao fato de que as mudanças no estado de maturação óssea são muito sutis, limitando-se ao aumento e fusão das estruturas já presentes.

### 3.2.2 Resultados do Método Tanner e Whitehouse (TW)

O Índice de Maturação óssea (IM) de cada indivíduo foi obtido segundo método descrito acima (item 3.1) e os resultados da média, desvio padrão e mediana para fêmeas e machos por classe etária estão descritos na tabela 10 e figura 16 abaixo.



**Figura 16. Box-plot das médias e desvios padrão do Índice de Maturação óssea (IM) para machos e fêmeas de *Trichechus inunguis* por idade cronológica, em anos.**

Os animais do estudo seccional foram incluídos nas análises e por motivos estatísticos foram agrupados em sete classes por idade cronológica em anos: de 0 a 0.5; de 0.51 a 1.0; de 1.1 a 2.0; de 2.1 a 4.0; de 4.1 a 6.0; de 6.1 a 10.0 e maior de 10 anos.

As amostras com os Índices de Maturação óssea calculados para machos e fêmeas foram comparadas pelo *Teste U* de *Wilcoxon-Mann-Whitney*. Não foram encontradas diferenças significativas entre os gêneros ( $p > 0.05$ ) para nenhuma classe etária.

**Tabela 10. Resultados do Índice de Maturação óssea (IM) usando o Método Tanner e Whitehouse (TW) modificado para peixes-bois da Amazônia, machos e fêmeas por classe etária, em anos.**

Classe etária	Índice de maturação óssea					
	Fêmeas			Machos		
	<i>N</i> *	Mediana	Média e desvio padrão	<i>N</i> *	Mediana	Média e desvio padrão
0-0.5	17	0	3.2 ± 5.5	10	0.5	1.1 ± 1.4
0.51-1.0	6	4.5	7.0 ± 6.5	6	6	6.2 ± 5.0
1.0-2.0	10	11	12.7 ± 6.6	12	6.5	8.8 ± 5.3
2.1-4.0	7	14	17.8 ± 5.8	14	19	18.2 ± 2.9
4.1-6.0	4	26.5	25.7 ± 2.6	14	22	22.1 ± 4.4
6.1-10.0	5	36	35.0 ± 2.9	8	35	32.2 ± 5.1
>10.1	7	35	41.1 ± 12.5	8	47	50.1 ± 14.5

\**N* igual ao número de animais avaliados.

### 3.2.3 Padrões métricos dos ossos usando o Método Eklöf e Ringertz (ER) modificado

Após a realização de testes estatísticos de Correlação Canônica para determinar quais ossos proporcionavam resultados mais precisos na estimativa da idade óssea em relação aos laudos radiográficos, verificou-se que o crescimento de todos os ossos da mão e punho satisfazia essa condição ( $p < 0.01$ ). Com isso, para determinar os padrões normais foram escolhidas seis medidas levando em consideração os seguintes fatores:

- a) Facilidade de obtenção da medida

- b) Presença do detalhe ósseo ao longo de toda a vida do animal
- c) Altos coeficientes de correlação entre o parâmetro medido e o tempo de cativeiro (valores maiores que 0.855)

Na tabela 11 abaixo estão listados todos os valores de correlação encontrados e em negrito estão os parâmetros escolhidos para o método. Sendo eles: comprimento dos metacarpos I e IV, falanges proximais III e V e falanges médias II e III.

**Tabela 11. Valores de correlação canônica encontrados entre as medidas ósseas e o tempo de cativeiro, em anos, para o peixe-boi da Amazônia.**

Medidas		Correlação Osso x Tempo de cativeiro (anos)		
Largura* e Comprimento†	Segundo carpo	0.720* (p <0.01)		
		0.768† (p <0.01)		
	Terceiro Carpo	0.824* (p <0.01)		
		0.885† (p <0.01)		
	Quarto carpo	0.817* (p <0.01)		
		0.865† (p <0.01)		
	Carpo Radial	0.766* (p <0.01)		
		0.788† (p <0.01)		
	Carpo intermédio	0.566* (p <0.01)		
		0.792† (p <0.01)		
Carpo Ulnar	0.614* (p <0.01)			
	0.846† (p <0.01)			
Comprimento	<b>Metacarpo I</b>	<b>0.905 (p &lt;0.01)</b>		
	Metacarpo II	0.883 (p <0.01)		
	Metacarpo III	0.870 (p <0.01)		
	<b>Metacarpo IV</b>	<b>0.897 (p &lt;0.01)</b>		
	Metacarpo V	0.894 (p <0.01)		
			Proximal	Média
	Falange I	0.875 (p <0.01)	-	-
	<b>Falange II</b>	0.913 (p <0.01)	<b>0.945 (p &lt;0.01)</b>	0.920 (p <0.01)
	<b>Falange III</b>	<b>0.948 (p &lt;0.01)</b>	<b>0.985 (p &lt;0.01)</b>	0.893 (p <0.01)
	Falange IV	0.945 (p <0.01)	0.936 (p <0.01)	0.888 (p <0.01)
	Falange V	<b>0.962 (p &lt;0.01)</b>	0.797 (p <0.01)	-

\*resultados encontrados para a largura medida

†Resultados encontrados para o comprimento medido

**Resultados em negrito indicam as medidas escolhidas para uso no método**

Para estabelecer as variações normais foram organizadas duas tabelas separadas por sexo (tabelas 12 e 13), com os padrões máximo, mínimo, média e

desvio padrão de cada um dos seis parâmetros escolhidos por classes de tempo. Por motivos estatísticos as tabelas de machos e fêmeas estão organizadas em classes etárias (em anos) diferentes, com um mínimo de quatro indivíduos por classe. Além disso, a amostra de machos não apresenta nenhum indivíduo de nove anos e por isso não está incluído na tabela.

**Tabela 12. Descrição dos parâmetros de comprimento ósseo (cm) medidos em machos de peixe-boi da Amazônia**

Classes etárias (anos)	Medidas em machos (cm)						
		metacarpo I	metacarpo V	falange proximal III	falange proximal V	falange média II	falange média III
	<b>N<sup>†</sup></b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>20</b>	<b>18</b>
0.0 - 1.0	Média	2.33 ± 0.35	4.01 ± 0.66	2.06 ± 0.39	1.8 ± 0.29	1.14 ± 0.17	1.44 ± 0.21
	Máximo	3.24	5.72	3.46	2.7	1.69	2.06
	Mínimo	1.74	3.25	1.67	1.39	0.88	1.19
	<b>N<sup>†</sup></b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>10</b>
1.01 - 2.0	Média	2.81 ± 0.47	5.14 ± 0.94	2.44 ± 0.25	2.10 ± 1.20	1.31 ± 0.09	1.71 ± 0.13
	Máximo	3.73	6.52	2.97	2.61	1.45	1.95
	Mínimo	2.27	3.92	2.09	1.9	1.14	1.56
	<b>N<sup>†</sup></b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
2.01 - 3.0	Média	3.16 ± 0.47	6.06 ± 0.92	2.86 ± 0.32	2.40 ± 0.24	1.45 ± 0.12	1.85 ± 0.16
	Máximo	3.89	7.06	3.33	2.91	1.58	2.01
	Mínimo	2.48	4.12	2.39	2.17	1.28	1.62
	<b>N<sup>†</sup></b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>
3.01 - 4.0	Média	3.70 ± 0.74	7.02 ± 1.16	3.18 ± 0.53	2.74 ± 0.55	1.60 ± 0.27	2.30 ± 0.46
	Máximo	5.17	9.19	4.17	3.66	2.06	3.01
	Mínimo	2.76	5.08	2.35	2	1.25	1.72
	<b>N<sup>†</sup></b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
4.01 - 6.0	Média	4.55 ± 0.84	8.11 ± 1.41	3.94 ± 0.61	3.29 ± 0.51	1.88 ± 0.25	2.52 ± 0.31
	Máximo	5.72	10.09	4.65	4.04	2.17	2.84
	Mínimo	3.5	6.1	3	2.5	1.5	1.9
	<b>N<sup>†</sup></b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
6.1 - 8.0	Média	5.06 ± 1.16	8.59 ± 1.75	4.27 ± 0.65	3.64 ± 0.52	2.22 ± 0.46	2.9 ± 0.42
	Máximo	6.31	11.01	5.07	4.1	2.75	3.43
	Mínimo	3.72	6.87	3.48	3.02	1.68	2.44
	<b>N<sup>†</sup></b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
> 10	Média	5.7 ± 0.41	9.61 ± 0.58	5.11 ± 0.49	4.29 ± 0.41	2.74 ± 0.41	3.60 ± 0.35
	Máximo	6.2	10.65	5.9	4.8	3.4	4
	Mínimo	5	8.7	3.6	3.6	2.2	3

<sup>†</sup>Número de indivíduos analisados

**Tabela 13. Descrição dos parâmetros de comprimento ósseo (cm) medidos em fêmeas de peixe-boi da Amazônia.**

Classes etárias (anos)	Medidas em fêmeas (cm)						
		metacarpo I	metacarpo V	falange proximal III	falange proximal V	falange média II	falange média III
	<b>N<sup>†</sup></b>	<b>22</b>	<b>22</b>	<b>22</b>	<b>22</b>	<b>22</b>	<b>20</b>
0.0 - 1.0	Média	2.36 ± 0.53	4.08 ± 0.79	2.00 ± 0.33	1.72 ± 0.27	1.09 ± 0.27	1.32 ± 0.1
	Máximo	3.29	5.84	2.87	2.23	2.23	1.54
	Mínimo	1.71	2.8	1.6	1.38	1.38	1.19
	<b>N<sup>†</sup></b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
1.01 - 2.0	Média	2.96 ± 0.51	5.38 ± 1.01	2.65 ± 0.52	2.17 ± 0.3	1.33 ± 0.23	1.69 ± 0.23
	Máximo	3.7	7	3.5	2.6	1.59	2.1
	Mínimo	2.1	3.7	1.7	1.6	1	1.3
	<b>N<sup>†</sup></b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
2.01 - 3.0	Média	3.19 ± 0.41	6.10 ± 0.28	2.79 ± 0.19	2.34 ± 0.08	1.50 ± 0.19	1.75 ± 0.16
	Máximo	3.74	6.51	2.42	2.42	1.72	1.91
	Mínimo	2.77	5.91	2.25	2.25	1.31	1.53
	<b>N<sup>†</sup></b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
3.01 - 5.0	Média	3.46 ± 0.32	6.57 ± 0.43	3.34 ± 0.36	2.61 ± 0.15	1.62 ± 0.14	2.08 ± 0.17
	Máximo	3.69	7.07	3.73	2.8	1.76	2.21
	Mínimo	2.9	5.9	2.92	2.42	1.4	1.8
	<b>N<sup>†</sup></b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
5.01 - 7.0	Média	3.91 ± 0.43	7.39 ± 0.47	3.51 ± 0.58	2.88 ± 0.44	1.69 ± 0.27	2.17 ± 0.28
	Máximo	4.5	7.74	4.11	3.27	2.08	2.53
	Mínimo	3.5	6.7	2.8	2.5	1.5	1.9
	<b>N<sup>†</sup></b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
7.1 - 10.0	Média	5.10 ± 0.29	8.10 ± 0.23	4.35 ± 0.44	3.62 ± 0.35	2.20 ± 0.4	2.96 ± 0.32
	Máximo	5.38	8.47	4.7	3.34	2.52	3.19
	Mínimo	4.6	7.85	3.6	3	1.5	2.4
	<b>N<sup>†</sup></b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
> 10	Média	5.12 ± 0.7	8.32 ± 1.04	4.06 ± 0.74	3.64 ± 0.58	2.3 ± 0.64	2.92 ± 0.62
	Máximo	6.1	9.7	5.2	4.4	3.1	3.7
	Mínimo	4.5	7.2	3.2	2.8	1.6	2.1

<sup>†</sup> Número de indivíduos analisados

### 3.3 Resultados do método ultrassonográfico

As imagens obtidas para adaptação do método métrico de Eklof e Ringertz no estudo utilizando-se aparelho portátil de ultra-som não foram satisfatórias.

Inicialmente as tentativas se concentraram em espécimes mortos e congelados (após descongelamento) com o intuito de familiarizar com a aparência ultrassonográfica da área e a facilidade de manuseio da nadadeira isolada. Tentou-se inicialmente a interposição de gel acústico sobre a área examinada; depois se tentou o uso de balões de látex cheios de água para criar uma janela acústica e aumentar o distanciamento entre o transdutor e a nadadeira peitoral; e por último a análise do objeto submerso em um tanque com água e transdutor mergulhado. Contudo, todas essas técnicas revelaram-se falhas, pois as imagens, quando sinalizavam o contorno ósseo, não o revelavam por completo, impossibilitando as medidas.

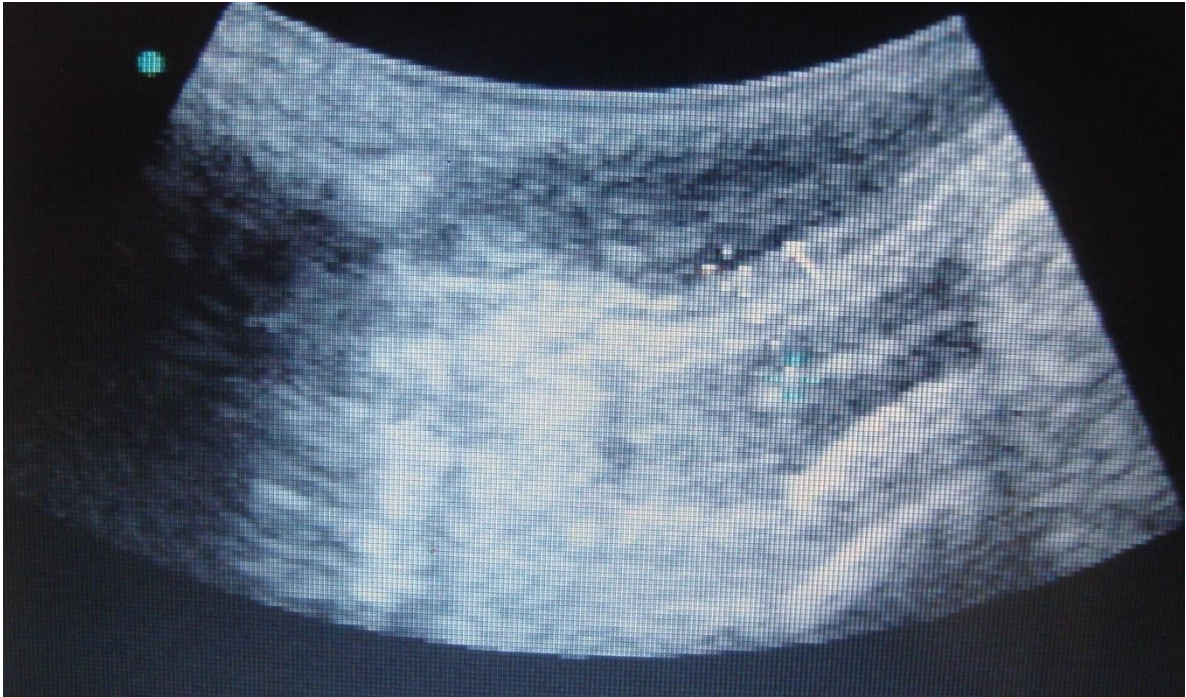


**Figura 17. Imagem de ultrassom, evidenciando a reverberação encontrada. Vista sagital de metacarpos em um filhote de peixe-boi da Amazônia.**

Foram também realizadas tentativas em nadadeiras de animais vivos, os quais não apresentaram sinal de estresse algum ao serem examinados nem necessitaram de contenção adicional. Os dois observadores (um inexperiente e um



experiente no uso do ultrassom) examinaram as imagens em conjunto e, apesar de obterem uma medida correta da largura dos metacarpos (fig. 18) (confirmada após comparação com a imagem radiográfica), não foi possível obter o comprimento (medida escolhida para o teste).



**Figura 18. Medida da largura (linha tracejada) de um metacarpo em um filhote de peixe-boi da Amazônia. Imagem de ultrassom.**

Adicionalmente, em animais maiores, cujas nadadeiras não permitiam a palpação para identificação correta dos ossos que estavam sendo avaliados, ficou difícil a precisão da identificação de qual osso aparecia na imagem (metacarpo III ou IV, por exemplo).

As imagens apresentavam artefatos: sombras acústicas, reverberações ou áreas muito hiperecóticas dificultando a precisão das estruturas (Fig. 17, 18 e 19).



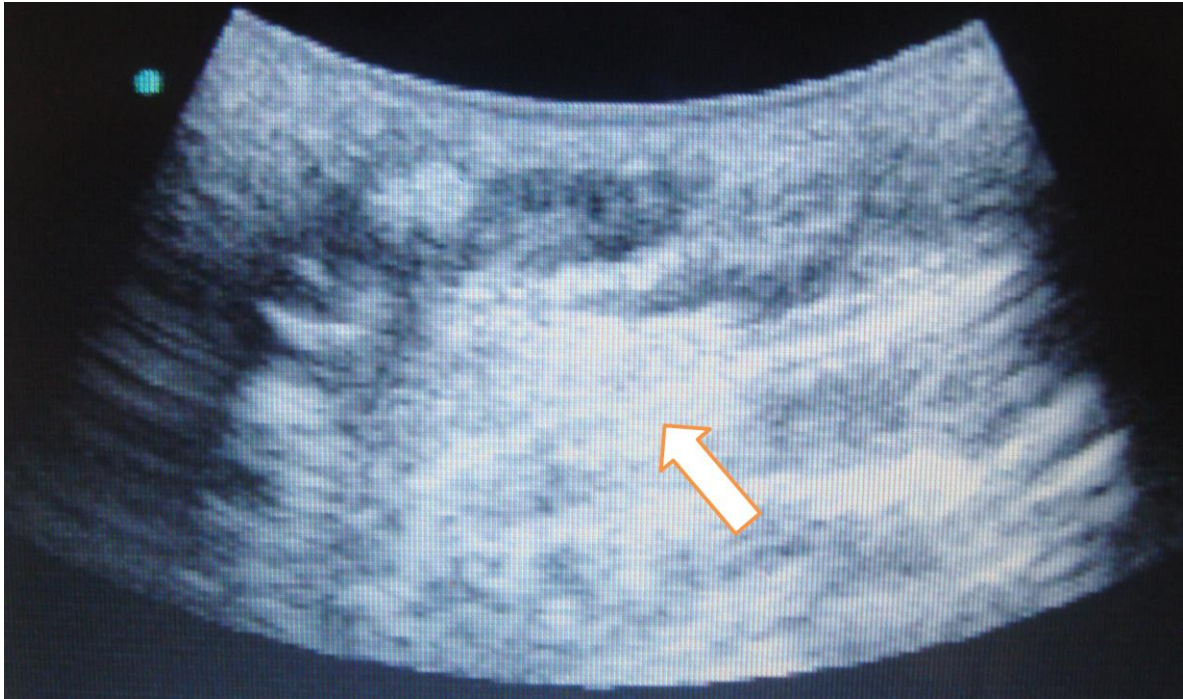


Figura 19. Imagem de ultrassom da nadadeira peitoral de um filhote de peixe-boi da Amazônia com região hiperecólica (Seta), dificultando a precisão das estruturas.

#### 4. Discussão

O Índice de Maturação (IM) proposto, com um máximo de quatro estágios por osso avaliado, difere do método Tanner e Whitehouse (TW3) mais recente. No caso do método TW3, cada osso pode ter até nove estágios (marcados de A até I) e as somas levam em consideração determinados “pesos” diferentes entre os elementos (Média ponderada) (Tanner et al., 2001). Humanos atingem a maturidade óssea, em média, com 15,0 anos nas meninas e 16,5 anos nos meninos (Tanner et al., 2001). Ambas são idades inferiores às propostas para a maturidade óssea no peixe-boi da Amazônia (conforme capítulo I). Embora essa separação em um grande número de estágios possa permitir, no caso de humanos, janelas de estimativas cronológicas menores, ele também dificulta sua aplicação. Da Silva et al. (2010) analisaram a importância do treinamento específico e com avaliadores experientes na formação de novos avaliadores do método TW3 e concluíram que um rigoroso processo de treinamento é essencial na preparação prévia do avaliador. O objetivo do IM proposto pelo presente trabalho foi exatamente simplificar essa avaliação, tornando a aplicação do método mais acessível e de fácil replicabilidade.

A separação dos índices ósseos em até quatro estágios também difere do proposto por Ogden et al. (1981) trabalhando com duas espécies de cetáceos: *Phocoenoides dalli dalli* e *Globicephala macrorhynchus*. Esses autores descreveram seis estágios de desenvolvimento ósseo das epífises distais do rádio e da ulna, e mencionam que o mesmo processo se repete nos ossos dos metacarpos e falanges dos cetáceos. O objetivo de Ogden et al (1981) foi somente descrever tais processos de desenvolvimento das epífises ósseas de maneira detalhada, em resposta ao trabalho de Hui (1977), e não o de correlacionar o nível de maturação com a idade cronológica, da maneira que foi o objetivo do presente trabalho.

Apesar de diferir em relação ao número de estágios de ossificação, foi observado nesse estudo, de maneira semelhante aos resultados encontrados por Ogden et al (1981) em cetáceos, que o peixe-boi da Amazônia também forma centros secundários de ossificação (epífises) em ambos os lados dos metacarpos e de várias falanges. Esse evento não ocorre em mamíferos terrestres e mamíferos semi-aquáticos (como os pinípedes, por exemplo) (Ogden et al., 1981).

Trabalhando com *Tursiops truncatus* (Cetacea), Hui (1977) propôs um Índice de Maturação da Nadadeira (“Flipper Index” – FI) com quatro estágios semelhantes ao apresentado neste trabalho, contudo, o índice somava os resultados encontrados em ambas as nadadeiras. Quando uma nadadeira não estava disponível, o resultado do IF era formado pela soma encontrada na nadadeira disponível multiplicada por dois. Não foram encontradas diferenças entre o desenvolvimento da nadadeira direita e esquerda para o peixe-boi da Amazônia (Capítulo I), e por isso, o IM calculado até poderia ser multiplicado por dois no presente trabalho. Contudo, Hui (1977) criou índices de maturidade em diversas regiões do corpo e a soma dos mesmos era levada em consideração na determinação da maturidade geral do indivíduo. O presente trabalho focou somente a região da “mão e punho” do peixe-boi, sendo assim, a multiplicação do índice por dois torna-se desnecessária.

Independente da quantidade de estágios escolhidos pelos autores para a descrição do processo de ossificação epifiseal em mamíferos aquáticos, cabe ressaltar que os eventos relatados são os mesmos (Hui, 1977; Ogden et al., 1981). A diferença consiste somente quanto à divisão desses eventos.

O peixe-boi da Amazônia possui um processo de ossificação endocondral lento (Fawcett, 1942), fato que proporciona a manutenção de determinado estágio por longos períodos de tempo e, conseqüentemente, as mudanças tornam-se mais sutis, sem grandes eventos característicos. Essa sutileza na maneira como as epífises evoluem revela-se tanto nos resultados do método Tanner e Whitehouse quanto nos resultados no método Greulich e Pyle visual. Ao compararmos qualitativamente as janelas cronológicas obtidas por ambos os métodos percebemos grandes intervalos de tempo onde os indivíduos possuem desenvolvimento ósseo semelhante.

Nos peixes-bois, após os seis anos de idade para ambos os sexos, torna-se cada vez mais difícil correlacionar mudanças visuais à idade cronológica dos indivíduos. Isso ocorre porque grande parte das epífises já aparece nas radiografias, e, embora o aparecimento dessas estruturas constitua um evento de mudança abrupta, a evolução e fusão das mesmas é um processo lento e contínuo. O número reduzido de indivíduos acima dessa idade dificultou a comprovação estatística desse fato.

No entanto, a observação de que apesar das grandes janelas cronológicas encontradas, o IM obtido no grupo anterior não difere muito do IM obtido no próximo grupo (Figura 16). Somada ao fato de que os machos e fêmeas avaliados não diferiram estatisticamente em nenhum dos métodos propostos, corrobora a afirmação de que esse desenvolvimento ocorre de forma extremamente lenta e gradual. Quando filhotes, visualmente, os machos desenvolvem as estruturas primeiro do que as fêmeas. Contudo, esse espaço de tempo entre o aparecimento é pequeno quando comparado ao tempo de evolução das mesmas, por isso quando agrupados com longo prazo, o desenvolvimento torna-se semelhante.

Hughes e Tanner (1970) descreveram o desenvolvimento ósseo de ratos de laboratório desde a vida intra-uterina até a completa maturidade física. O número de estágios entre as estruturas ósseas variou de nove (para o osso *calcaneum*) até quinze (para o fêmur e tibia). Os ossos avaliados no membro superior (úmero, rádio, ulna, metacarpos II-IV e falanges proximais II-IV) possuíam um ranque de dez estágios. A diferença entre esse número de estágios e o número de estágios propostos nesse estudo para o peixe-boi da Amazônia deve-se principalmente ao

fato de que Hughes e Tanner (1970) descreveram os processos de ossificação endocondral a partir da vida uterina e os primeiros quatro estágios descritos ocorrem durante o desenvolvimento fetal dos ossos.

Em humanos (Tanner & Whitehouse, 1959), primatas não-humanos (Hamada et al., 2003) e roedores (Hughes & Tanner, 1970) as fêmeas são mais avançadas no desenvolvimento ósseo do que os machos da mesma idade. Esses autores compararam diagramas de velocidade de desenvolvimento das estruturas separados por gêneros e classes etárias, o que não foi realizado pelo presente estudo. Esse tipo de comparação permite a observação de surtos de desenvolvimento em determinados períodos de tempo e estudos adicionais podem ser realizados com o peixe-boi da Amazônia visando à elucidação dessa questão. A presença, ou não, desses surtos pode ser correlacionada ainda com os níveis de hormônios sexuais circulantes e momento de maturidade sexual conforme proposto por Hughes e Tanner (1970) e Hamada et al. (2003), para ratos e macacos, respectivamente.

Mesmo sem dimorfismo sexual aparente durante o desenvolvimento ósseo geral das nadadeiras, os peixes-bois machos estão atingindo a maturidade da região após as fêmeas e com tamanhos maiores. Resultado semelhante ao encontrado por outros autores trabalhando com diversas ordens de mamíferos (Tanner & Whitehouse, 1959; Greulich & Pyle, 1959; Hughes & Tanner, 1970; Hamada et al., 2003).

Diferenças sexuais no comprimento e largura dos ossos em roedores foram descritas por Hughes e Tanner (1973). Essa comparação estatística entre os sexos não pôde ser realizada no presente estudo porque o método métrico proposto (método ER modificado) não gerou a mesma janela de classes de idade para machos e fêmeas (tabelas 12 e 13, respectivamente), impossibilitando a comparação entre classes. No entanto, observa-se que a diferença entre as medidas nos estágios para machos e fêmeas é sempre inferior a 1 cm.

Comparando qualitativamente o atlas proposto para o peixe-boi da Amazônia com o trabalho de Greulich e Pyle (1959) para meninos e meninas europeus, observa-se claramente a diferença entre as janelas de desenvolvimento

apresentadas. O trabalho de Greulich e Pyle (1959) demonstra a classificação em apenas meses de diferença nas crianças e no máximo um ano de diferença para os adolescentes, enquanto no caso do peixe-boi da Amazônia, os filhotes até apresentam um diferença medida em meses, contudo as janelas tornam-se cada vez maiores com o aumento da idade.

Isso ocorre porque após os aparecimentos dos centros de ossificação secundários as mudanças nas imagens tornam-se relacionadas a aumentos de tamanho das estruturas. Esse aumento gradual e a posterior fusão e desaparecimento dos elementos ocorre de maneira especialmente lenta nos peixes-bois da Amazônia. Observando as imagens escolhidas como padrão nas idades entre 3-4 anos e 4-6 anos em ambos os sexos (Anexos III e IV, letras E e F) percebemos claramente a demora nessa ossificação endocondral. Apesar de extremamente semelhantes, tratam-se de radiografias distintas obtidas no espaço de tempo descrito de até três anos.

A manutenção dessas imagens tão semelhantes no atlas foi permitida com o intuito de reafirmar os dados obtidos no capítulo I e nesse capítulo, e exemplificam as dificuldades superadas e parte das tentativas frustradas no desenvolvimento de metodologias que diminuíssem as janelas de tempo encontradas. Conclui-se que a adaptação do método de avaliação visual de Greulich e Pyle (1959) para o peixe-boi da Amazônia, apesar de acurado, possui baixa precisão porque o universo de tempo considerado é muito extenso (janelas cronológicas maiores do que três anos, podendo chegar a onze anos). Sendo assim, tal método produz respostas do tipo: indivíduo mais desenvolvido do que “X” anos e menos desenvolvido do que “Y” anos; e não do tipo: indivíduo com “Z” anos de idade.

Em relação aos resultados do método Tanner e Whitehouse (TW) para *Trichechus inunguis* observa-se a obtenção novamente de grandes janelas de tempo, no entanto, esse método pode ter sido prejudicado pelo fato de que um número pequeno de fêmeas entre 4,1-6,0 anos (total de quatro fêmeas analisadas) foram consideradas na amostra. Isso porque em uma tentativa de desenvolver a mesma janela de tempo para ambos os sexos, automaticamente, as janelas de tempo ficaram com um intervalo de dois anos a partir dos dois anos de cativeiro e

com quatro anos de intervalo entre 6,1 e 10 anos (considerando um mínimo de quatro animais de cada gênero analisados por intervalo, tabela 10).

Por tratar-se de um índice calculado (dados não paramétricos) e não de uma variável contínua (dados paramétricos) o melhor parâmetro observado é o resultado descrito pela Mediana e não os resultados das médias com desvios-padrão (Zar, 2010). Tal fato é facilmente percebido quando observamos os altos desvios calculados (com valores entre 2,6 e 14,5), resultantes do modo como o índice é calculado, onde o menor valor somado ou reduzido é sempre igual a um ponto inteiro. Esses resultados fazem com que as médias junto com os desvios se sobreponham em todas as faixas de tempo escolhidas (Figura16), impossibilitando a criação de uma norma para a espécie.

Então, se analisarmos os valores de mediana obtidos, somados ao fato de que o IM será sempre um valor inteiro, podemos estimar com maior segurança o tempo de cativo desses animais (tabela 10). Além disso, observando os dados brutos, a afirmação de que machos desenvolvem os detalhes ósseos primeiro, mas atingem a maturidade completa depois das fêmeas é corroborada. Pela tabela criada, fêmeas apresentam valores de IM iguais a zero nos primeiros seis meses de cativo, enquanto machos apresentam valores de IM próximos a meio (significando valor de um ponto porque o IM é sempre um número inteiro). Com um ano de cativo a diferença de um ponto permanece, com fêmeas obtendo valores de IM de quatro e meio e machos com seis pontos. Contudo, a partir do primeiro ano a situação se inverte e os machos apresentam valores em torno de 6,5 enquanto fêmeas possuem IM ao redor de 11. Durante o segundo e quarto anos novamente reverte, com machos e fêmeas apresentando valores iguais a 19 e 14, respectivamente. Após esse tempo se inverte novamente e permanece invertida com fêmeas apresentando valores superiores.

É importante ressaltar que estatisticamente o IM não diferiu entre machos e fêmeas para nenhuma das classes propostas. Conclui-se que o método Tanner e Whitehouse adaptado para o peixe-boi da Amazônia, embora acurado, também não apresenta muita precisão a partir dos seis anos (com uma janela de quatro anos). A aplicabilidade do método TW é mais fácil e menos subjetiva do que o método de Greulich e Pyle ao transformar uma variável qualitativa (presença e ausência) em

uma variável quantitativa (escores numéricos) ainda que os dados permaneçam como não-paramétricos. Adicionalmente, não é necessária a observação detalhada de 31 centros de ossificação em comparação com a série de imagens-padrão como um todo. O método TW leva em consideração um número menor de parâmetros que são avaliados individualmente e somente depois somados (conforme descrição no item 3.1).

Os resultados obtidos pela adaptação do método de Eklof e Ringertz (1967) geraram duas tabelas de dados precisos e com janelas de tempo de no máximo três anos para indivíduos com até dez anos de cativeiro. Os resultados possuem pequenos desvios-padrão (o maior desvio encontrado foi de 1,75 cm, e a maioria dos desvios encontrados foi inferior a um centímetro). Por ser um método que usa valores numéricos (dados paramétricos) de comprimento, ele se torna o mais objetivo de todos os demais métodos testados e de fácil execução.

A opção pela escolha de seis parâmetros ósseos ao invés dos dez parâmetros utilizados pelo método ER tradicional baseou-se no trabalho de Olivete Junior et al. (2005), os quais desenvolveram um software de simplificação do método ER para estimativa de idade óssea em humanos. Esses autores conseguiram estimar com sucesso a idade de pacientes utilizando somente três ou cinco medidas, ao invés das dez medidas inicialmente propostas. Apesar de encontrarmos alguma sobreposição de medidas em algumas janelas de tempo (se considerarmos os valores máximos e mínimos encontrados), quando avaliamos todas as seis medidas é possível estimar com segurança a idade óssea dos peixes-bois. Novamente percebe-se o crescimento lento desses animais, cujas estruturas ósseas medidas estão crescendo muitas vezes menos do que um centímetro, em média, a cada dois anos (tabelas 12 e 13). Recomenda-se que um número maior de indivíduos da espécie seja analisado na tentativa de diminuir essas janelas de tempo encontradas em todos os métodos propostos.

Conclui-se que o método Eklof e Ringertz adaptado para o peixe-boi da Amazônia é uma alternativa eficiente, simples, acurada e precisa de estimativa de idade óssea. E que pode ser adotada, sozinha ou em conjunto com os demais métodos, na tentativa de classificar o desenvolvimento cronológico dos indivíduos. Apesar de não testado pelo presente trabalho, observou-se que muitas das

nadadeiras avaliadas permitiam a palpação e identificação desses ossos específicos utilizados para o desenvolvimento das tabelas, esse fato poderia indicar a possibilidade de se obter medidas de comprimento diretamente das nadadeiras sem a necessidade de avaliação radiológica. Estudos posteriores tornam-se necessários para testar essa hipótese.

O método ultrassonográfico provou-se falho, conforme descrito nos resultados. A escolha do método radiográfico de ER na tentativa de adaptação para a espécie pode ter sido equivocada; Bilgili et al. (2003) adaptaram com sucesso o método de Greulich e Pyle para a estimativa de idade utilizando o ultrassom em crianças até seis anos de idade. Esses autores criaram atlas alternativos com marcações que simbolizam a presença e ausência dos centros de ossificação do carpo e epífises dos outros ossos avaliados.

O presente estudo não testou essa hipótese, mesmo assim, alguns problemas encontrados se repetiram. Do mesmo modo que nesse trabalho não foi possível precisar a forma das estruturas, Bilgili et al (2003) relatam que a incapacidade de observar a morfologia das epífises por meio de ultrassom atrapalha a estimativa de idade, principalmente em crianças mais velhas.

Wagner et al. (1995) sugerem que em humanos, a avaliação ultrassonográfica da apófise do íleo e da epífise distal do rádio é uma ferramenta útil na determinação de idade. Castriota-scanderberg et al. (1998), no entanto, também avaliaram os ossos do quadril na estimativa de idade por meio de ultra-som e concluíram que o método possuía uma baixa acurácia.

Concluiu-se que o método ultrassonográfico não é indicado para a obtenção de medidas ósseas, porém estudos focados em outras regiões do corpo ou baseados em outros métodos (Greulich e Pyle, por exemplo) podem ser positivos na tentativa de se estimar idade.

## **5. Referências Bibliográficas**

Airina, R.K.J.I.; Nizam, A.R.M.; Abdullah, R.B.; Khadijah, W.E.W. 2011. Using Fetal-Heart Size Measured from Ultrasound Scanner Images to Estimate Age of Gestation in Goat. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 10(19): 2528-2540.



Albuquerque Jr., D.P. 2003. *Descrição Histológica do tecido ósseo do domo timpânico, estimativa de idade e crescimento do peixe-boi da Amazônia Trichechus inunguis (Natterer, 1883) Mammalia, Sirenia*. Dissertação de mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, Amazonas. 100pp.

Amaral, R. S.; da Silva, V. M. F.; Rosas, F.C.W. 2010. Body weight/length relationship and mass estimation using morphometric measurements in Amazonian manatees *Trichechus inunguis* (Mammalia: Sirenia). *Marine Biodiversity Records*, 3(105): 1-4.

Beatty, .L.; Vitkovski, T.; Lamert, O.; Macrini, T.E. 2012. Osteological associations with unique tooth development in manatees (*Trichechus*, Sirenia): A Detailed look at modern *Trichechus* and a review of the fossil record. *The anatomical Record*, 295(9): 1504-1512.

Bilgili, Y.; Hizek, S.; Kara, S.A.; Sanli, C.; Erdal, H.H.; Altinok, D.; 2003. Accuracy of skeletal age assessment in children from birth to 6 years of age with the ultrasonographic version of the Greulich-Pyle atlas. *Journal of ultrasound Medicine*. 22: 683-690.

Bontrager, K.L. 2003. *Tratado de técnica radiológica e base anatômica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, BR. 840pp.

Brant, W.E. 2007. Diagnostic imaging methods. In: Brant, W.E.; Helms, C.A. (Eds) *Fundamental of diagnostic Radiology*. Lippincott Williams & Wilkins, EUA. Ed. 3, 3995 pp.

Calzada, N.; Aguilar, A. 1996. Flipper development in the Mediterranean Striped dolphin (*Stenella Coeruleoalba*). *The Anatomical Record*, 245: 708-714.

Castriota-Scanderbeg A, Sacco MC, Emberti-Gialloreti L, Fraracci L. 1998. Skeletal age assessment in children and young adults: comparison between a newly developed sonographic method and conventional methods. *Skeletal Radiology*, 27: 271–277.

Da Silva, S.P.; de Freitas, D.L.; Beunen, G.P.; Maia, J.A.R. 2010. Maturação biológica: da sua relevância à aprendizagem do método TW3. *Revista Brasileira Cineantropometria & Desempenho Humano*. 12(5): 352-358.

da Silva, V.M.F.; Rosas, F.C.W.; Cantanhede, A.M. 2008. Peixe-boi da Amazônia, *Trichechus inunguis* (Natterer, 1883). In: Machado, A.B.M.; Drummond, G.M; Paglia, A.P. (Eds) *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Ministério do Meio Ambiente e Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, MG, BR. pp. 816-818.

Danil, K.; Robertson, K.M.; Chivers, S.J. 2004. An evaluation of using enhanced digital microscopy to estimate ages of short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*). *NOAA Technical Memorandum NMFS*. National Marine Fisheries Service, NOAA, La Jolla, CA, USA. 32pp.

- Delaney, R.; Marsh, H. 1995. Estimating the Age of Wild Rock-wallabies by Dental Radiography: a Basis for Quantifying the Age Structure of a Discrete Colony of *Petrogale assimilis*. *Wildlife Resources*, 22: 547-559.
- Domning, D.P. 2012. The Early Years of the Amazonian Manatee Project at INPA, Manaus, Brazil. *Aquatic Mammals*, 38(2): 204-222.
- Domning, D.P.; Hayek, L.A.C. 1984. Horizontal tooth replacement in the Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*). *Mammalia*, 48:105–127.
- Drost, W.T. 2002. Basic Ultrasound physics. *In.*: Thrall, D.E. (Eds) *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology*. Saunders, EUA. Ed. 4. 764 pp.
- Eklof, O. Ringertz, H. 1967. A method for assessment of skeletal maturity. *Annals of Radiology*, 10(3-4): 330-336.
- Fawcett, D.W. 1942. The amedullary bones of the Florida manatee (*Trichechus latirostris*). *American Journal of Anatomy*, 71(2): 271-309.
- Francisco, F.C.; Maymone, W.; Carvalho, A.C.P.; Francisco, V.F.M.; Francisco, M.C. 2005. Radiologia: 110 anos de história. *Revista Imagem*. 27(4): 281-286.
- Greulich, W.W.; Pyle, S.I. 1959. *Radiographic Atlas of Skeletal Development of the Hand and Wrist*. Stanford University Press, Palo Alto, CA, USA. 256pp.
- Guglielmini, C.; Zotti, A.; Bernardini, D.; Pietra, M.; Podestá, M.; Cozzi, B. 2002. Bone density of the arm and forearm as an age indicator in specimens of stranded striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *The Anatomical Record*, 267: 225-230.
- Haiter Neto, F.; Almeida, S.M.; Leite, C.C. 2000. Estudo comparativo dos métodos de estimativas de idade óssea de Greulich & Pyle e Tanner & Whitehouse. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 14(4): 378-384.
- Hamada, Y.; Chatani, K.; Udono, T.; Kikuchi, Y.; Gunji, H. 2003. A longitudinal study on hand and wrist skeletal maturation in chimpanzees (*Pan troglodytes*), with emphasis on growth in linear dimensions. *Primates*, 44: 259-271
- Hughes, P.C.R.; Tanner, J.M. 1970. The assessment of skeletal maturity in the growing rat. *Journal of Anatomy*, 106(2): 371-402.
- Hughes, P.C.R.; Tanner, J.M. 1973. A radiographic study of the growth of the rat pelvis. *Journal of Anatomy*, 114(3): 439-448.
- Hui, C.A. 1979. Correlates of maturity in the common dolphin, *Delphinus delphis*. *Fishery Bulletin*, 77: 295-300.
- IUCN. 2010. IUCN Red list of threatened species. Versão 2010.4. (<http://www.iucnredlist.org>). Acesso: 14/06/11.

Kähn, W. 1992. Ultrasonography as a diagnostic tool in female animal reproduction. *Animal Reproduction Science*. 28: 1-10.

Khade, N.B.; Patel, D.M.; Naikoo, M. 2011. Early pregnancy diagnosis using transrectal ultrasonography in Gir cattle. *Indian Journal of Field Veterinarians*. 7(1):43-46.

Lacave, G.; Eggermont, M.; Verslycke, T.; Brook, F.; Salbany, A.; Roque, L.; Kinoshita, R. 2004. Prediction from ultrasonographic measurements of the expected delivery date in two species of bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus* and *Tursiops aduncus*). *The Veterinary Record*, 154:228-233.

Maciel, G.C.; Da Silva, V.M.F. 2009. Avaliação do uso de costelas para estimativa de idade em peixes-bois. 61ª Reunião anual SBPC. Manaus, AM. Anais eletrônicos... (<http://www.spbnet.org.br/livro/61ra/resumos/resumos/6908.htm>). Acesso: 14/06/11.

Marmontel, M.; Nhea, T.J.; Kochman, H.I.; Humphrey, S.R. 1996. Age estimation in manatees using growth-layer-group counts in bone. *Marine Mammal Science*, 12(1):54-88.

Marsh, H. 1980. Age Determination of the Dugong (*Dugong dugon* (Miller)) in Northern Australia and its Biological Implications. *Reports of IWC*. 3:181-201.

Mellor, L.; Cooper, L.N.; Torre, J.; Brownell Jr, R.L. 2009. Paedomorphic ossification in porpoises with an emphasis on the vaquita (*Phocoena sinus*). *Aquatic Mammals*, 35(2):193-202.

Mentzel, H-J.; Vilser, C.; Eulenstein, M.; Scharz, T.; Vogt, S.; Böttcher, J.; Yaniv, I.; Tsoref, L.; Kauf, E.; Kaiser, W.A. 2005. Assessment of skeletal age at the wrist in children with a new ultrasound device. *Pediatric Radiology*, 35:429-433.

Ogden, J.A.; Conlogue, G.J.; Rhodin, A.G.J. 1981. Roentgenographic indicators of skeletal maturity in marine mammals (Cetacea). *Skeletal Radiology*, 7:119-123.

Olivete Junior, C. 2005. *Estimativa de idade óssea através da análise carpal baseada na simplificação do método Eklof & Ringertz*. Dissertação de mestrado. Escola de engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo. São Carlos, São Paulo. 112pp.

Pereira, A.P.E.; Dias, M.A.B.; Bastos, M.H.; Da Gama, S.G.N.; Leal, M.C. 2013. Determining gestational age for public health care users in Brazil: comparison of methods and algorithm creation. *BMC Research Notes*, 6:60.

Rihab, M.A.; Bushra, H.A.; Salah, M.A.; Mohamed, T.I. 2012. The accuracy of gestational age predicted from femur and humerus length in Saanen goats using ultrasonography. *Acta Vetrinaria (BRNO)*, 81:295-299.

Rosas, F.C.W.; Pimentel, T.L. 2001. Order Sirenia (Manatees, Dugongs, Sea Cows). In: Fowler, M.E.; Cubas, Z.S. (Eds). *Biology, Medicine, and surgery of south*

*American wild animals*. Iowa State University Press/AMES, Iowa, IA, USA. p.352-362.

Roston, R.A.; Lickorish, D.; Buchholtz, E.A. 2013. Anatomy and Age Estimation of an Early Blue Whale (*Balaenoptera musculus*) Fetus. *The Anatomical Record*, 296:709–722.

Santos, M.C. de O.; Rosso, S.; Ramos, R.M.A. 2003. Age estimation of marine tucuxi dolphins (*Sotalia fluviatilis*) in south-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83:233-236.

Shah, S.; Teismann, N.; Zaia, B.; Vahidnia, F.; River, G.; Price, D.; Nagdev, A. 2010. Accuracy of emergency physicians using ultrasound to determine gestational age in pregnant women. *The American Journal of Emergency Medicine*, 28(7):834-838.

Sinclair, W.K. 2012. Cyclic X-Ray Responses in Mammalian Cells *in Vitro*. *Radiation Research*, 178(2):112-124.

Stewart, R.E.A.; Stewart, B.E.; Stirling, I.; Street, E. 1996. Counts of growth layer groups in cementum and dentine in ringed seals (*Phoca hispida*). *Marine Mammal Science*, 12(3):383-401.

Tanner, J.M.; Healy, M.J.R.; Goldstein, H.; Cameron, N. *Assessment of skeletal maturity and prediction of adult height (TW3 Method)*. Ed. 3. W.B. Saunders. 2001.

Tanner, J.M.; Whitehouse, R.H. 1959. *Standarts for skeletal maturation*. Paris: international Children`s Center.

Vergara-Parente, J.E. 2009. *Estimativa de idade e crescimento de sirênios no Brasil*. Tese de doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco. 71p.

Wagner UA, Diedrich V, Schmitt O. 1995. Determination of skeletal maturity by ultrasound: a preliminary report. *Skeletal Radiology*. 24:417–420.

Wu, F.S-Y.; Hwu, Y-M.; Lee, R.K-K.; Li, S-H.; Sun, F-J.; Lin, M-H.; Lin, S-Y. 2012. First trimester ultrasound estimation of gestational age in pregnancies conceived after in vitro fertilization. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 160(2):151-155.

#### **4. Síntese do Trabalho**

O presente trabalho se propôs a avaliar o desenvolvimento ósseo das nadadeiras peitorais do peixe-boi da Amazônia por métodos radiográficos e utilizar o padrão de desenvolvimento observado na construção de possíveis métodos de estimativa de idade.

Os resultados encontrados demonstraram claramente tratar-se de uma espécie de desenvolvimento lento e maturidade óssea tardia. Não foram encontradas características diferentes no modo como os centros de ossificação estão se desenvolvendo entre machos e fêmeas, contudo algumas diferenças visuais entre o tempo de evolução puderam ser observadas. O número reduzido de indivíduos por classe etária impossibilitou a comprovação estatística dessa afirmação.

Entre os métodos escolhidos para formulação de padrões de estimativa de idade encontram-se três metodologias que utilizam os raios-x e uma metodologia que utiliza o ultrassom. As três primeiras forneceram resultados acurados, mas não muito precisos. A metodologia baseada no uso de ultra-som foi falha e não adequada para estimativas de idade no peixe-boi da Amazônia.

Segue abaixo uma análise acerca dos resultados gerais baseando-se nos objetivos gerais apresentados no início desse trabalho.

##### ***4.1. Em relação ao objetivo específico I***

Para estimar a idade por meio da avaliação de radiografias dos membros torácicos foram adaptados três métodos (GP, TW e ER), para ambos os sexos, relacionando os achados nas radiografias por cada método e a idade cronológica dos indivíduos analisados.

Os três métodos foram aplicados a partir das mesmas séries de radiografias (as séries de radiografias utilizadas foram descritas caso a caso), com algumas exceções em relação ao número de imagens analisadas, devido ao fato de

atingirem, ou não, critérios específicos. Os achados foram descritos de maneira independente e não influenciaram os resultados dos demais métodos.

Conclui-se que esse objetivo foi atingido, apesar de não ter gerado o conjunto de dados precisos esperados, a descrição desses métodos possibilita uma visão inicial das dificuldades a serem superadas na busca de uma metodologia segura, indolor e precisa de estimativa de idade cronológica para indivíduos vivos de peixe-boi da Amazônia. E espera-se que esses resultados incentivem novas pesquisas acerca do desenvolvimento ósseo de outras regiões do corpo, desenvolvimento ósseo fetal e correlações entre idade cronológica x desenvolvimento físico x maturidade sexual e física.

#### ***4.2. Em relação ao objetivo específico II***

O método escolhido para estimar a idade por meio da avaliação ultrassonográfica dos membros torácicos provou-se falho. Contudo, novas tentativas em outras regiões do corpo e utilizando outros parâmetros de avaliação talvez sejam possíveis. Adicionalmente, o acompanhamento do desenvolvimento fetal específico de órgãos e ossos pode fornecer outros locais de interesse no acompanhamento de desenvolvimento pós-natal na espécie.

Estudos futuros devem ser realizados para uma melhor descrição do uso desse tipo de tecnologia em acompanhamentos cronobiológicos na espécie.

#### ***4.3. Em relação ao objetivo específico III***

Sempre que possível a comparação estatística e visual entre os sexos foi realizada. Foram encontradas diferenças relacionadas ao desenvolvimento do comprimento total do corpo com o comprimento das nadadeiras peitorais. Os resultados das regressões logísticas de tempo de aparecimento das estruturas ósseas também apresentaram diferenças das avaliações visuais quando comparados entre machos e fêmeas.

Machos e fêmeas iniciam o desenvolvimento da mesma forma e terminam com a fusão das mesmas estruturas. Contudo, observações visuais demonstraram que os machos demoram um tempo maior para completar seu desenvolvimento ósseo, e, no entanto, alguns centros secundários de ossificação aparecem primeiro do que nas fêmeas. Anatomicamente não existe dimorfismo sexual entre as nadadeiras peitorais para o peixe-boi da Amazônia.

Espera-se que estudos específicos sobre a velocidade de crescimento/desenvolvimento dos ossos em períodos definidos de tempo de vida sejam estimulados e respondam a perguntas como: Machos e fêmeas possuem “explosões” de crescimento na mesma fase de desenvolvimento? Qual a influência da puberdade no desenvolvimento ósseo de ambos os sexos?

#### **4.4. Em relação ao objetivo específico IV**

Conclui-se que os dois atlas criados para *T. inunguis*, embora compreendam grandes janelas de tempo e consequentes poucas imagens-padrão, trazem informações importantes e inéditas acerca de como essa região do corpo esta se desenvolvendo e as variações na anatomia local decorrentes desse desenvolvimento temporal e posterior maturidade.

A continuação do acompanhamento individual dos indivíduos utilizados no estudo pode ajudar a responder algumas questões não resolvidas pelo trabalho, como o exato tempo de fusão dos ossos e a variação no tempo de desenvolvimento dessas estruturas para períodos específicos de tempo em machos e fêmeas (possível “boom de crescimento” relacionado à puberdade).

#### **4.5. Em relação ao objetivo específico V**

A comparação entre os métodos radiográficos e ultrassonográficos não pôde ser realizada porque o método ultrassonográfico não gerou resultados positivos. Os métodos radiográficos quando comparados entre si demonstraram que, apesar de

serem acurados possuem diferentes graus de precisão e diferenças na facilidade de aplicação.

A escolha do método deve se basear no tipo de janela temporal esperada: os métodos visuais (GP e TW) possuem janelas menores quando o animal é mais jovem, mas o método métrico (ER) apresenta melhores janelas com animais mais velhos. Em termos de objetividade, o método ER não apresenta resultados que possam ser influenciados pela avaliação subjetiva do observador, o que é possível de acontecer quando utilizamos os dois métodos visuais (GP e TW).

## 5. Apoio Logístico

Durante as atividades do mestrado e análise de dados, foram utilizadas as dependências físicas do Laboratório de Mamíferos Aquáticos (LMA) do INPA e do Centro de Preservação e Pesquisas de Mamíferos Aquáticos (CPPMA).

## 6. Bibliografia Geral

Airina, R.K.J.I.; Nizam, A.R.M.; Abdullah, R.B.; Khadijah, W.E.W. 2011. Using Fetal-Heart Size Measured from Ultrasound Scanner Images to Estimate Age of Gestation in Goat. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(19):2528-2540.

Albuquerque Jr., D.P. 2003. *Descrição Histológica do tecido ósseo do domo timpânico, estimativa de idade e crescimento do peixe-boi da Amazônia Trichechus inunguis (Natterer, 1883) Mammalia, Sirenia*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, Amazonas. 100pp.

Amaral, R. S.; Da Silva, V. M. F.; Rosas, F.C.W. 2010. Body weight/length relationship and mass estimation using morphometric measurements in Amazonian manatees *Trichechus inunguis* (Mammalia: Sirenia). *Marine Biodiversity Records*, 3(105):1-4.

Araujo, J.C. 2003. *Anatomia dos animais domésticos: Aparelho locomotor*. Editora Manole Ltda, Barueri, SP, BR. 270pp.

Bazzini, M.D.; Reynolds III, J.E.; Essman, R.A. 1986. Erythropoiesis and granulopoiesis in the West Indian manatee, *Trichechus manatus* (Mammalia: Sirenia). *Acta Anatomica*, 126:150-152.



Beatty, .L.; Vitkovski, T.; Lamert, O.; Macrini, T.E. 2012. Osteological associations with unique tooth development in manatees (*Trichechus*, Sirenia): A Detailed look at modern *Trichechus* and a review of the fossil record. *The anatomical Record*, 295(9):1504-1512.

Best, R.C. 1981. Foods and feeding habits of wild and captive Sirenia. *Mammal Review*, 11(1):3-29.

Best, R.C. 1984. The aquatic mammals and reptiles of the Amazon. In: Sioli, H. (Ed). *The Amazon, Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster. p. 371-377

Bilgili, Y.; Hizel, S.; Kara, S.A.; Sanli, C.; Erdal, H.H.; Altinok, D.; 2003. Accuracy of skeletal age assessment in children from birth to 6 years of age with the ultrasonographic version of the Greulich-Pyle atlas. *Journal of Ultrasound Medicine*, 22:683-690.

Bontrager, K.L. 2003. *Tratado de técnica radiológica e base anatômica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, BR. 840pp.

Brant, W.E. 2007. Diagnostic imaging methods. In: rant, W.E.; Helms, C.A. (Eds). *Fundamental of diagnostic Radiology*. Lippincott Williams & Wilkins, EUA. Ed. 3, 3995pp.

Britt Jr., J.O.; Howard, E.B. 1983. The hematopoietic system. In: Howard, E.B. (Ed). *The Pathobiology of marine mammal diseases*. Saunders, Philadelphia. Vol. 2. p. 65-78.

Butti, C.; Corain, L.; Cozzi, B.; Podesta, M.; Pirone, A.; Affronte, M.; Zotti, A. 2007. Age estimation in the Mediterranean bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu 1821) by bone density of the thoracic limb. *Journal of Anatomy*, 211:639-646.

Calles, A.C.; Carinhena, G. 2004. Avaliação da idade óssea em indivíduos portadores da síndrome de Down por meio de radiografias da mão e punho. (<http://www.cleber.com.br/orto2004/andréia.html>). Acesso: 07/06/11.

Calzada, N.; Aguilar, A. 1996. Flipper development in the Mediterranean Striped dolphin (*Stenella Coeruleoalba*). *The Anatomical Record*, 245:708-714.

Carvalho, A.A.F. 1993. Estimativa de valores médios de crescimento em crianças com idade cronológica variando de 84 a 131 meses. *Revista de Odontologia da UNESP*, 22(2):293-301.

Castriota-Scanderbeg A, Sacco MC, Emberti-Gialloreti L, Fraracci L. 1998. Skeletal age assessment in children and young adults: comparison between a newly developed sonographic method and conventional methods. *Skeletal Radiology*, 27:271–277.

Colares, F.A.P. 2002. *Estudo de modelos não lineares de crescimento em peixe-boi marinho *Trichechus manatus manatus* e peixe-boi Amazônico *Trichechus inunguis**

(*Mammalia: Sirenia*) em cativeiro. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Cooper, L.N. 2008. Forelimb Anatomy. In: Perrin, W.F.; Würsig, B.; Thewissen, J.G.M. (Eds). *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press, California, CA, USA. p. 449-452.

Cooper, L.N.; Dawson, S.D. 2009. The trouble with flippers: a report on the prevalence of digital anomalies in Cetacea. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 155:722-735.

Da Silva, S.P.; de Freitas, D.L.; Beunen, G.P.; Maia, J.A.R. 2010. Maturação biológica: da sua relevância à aprendizagem do método TW3. *Revista Brasileira Cineantropometria & Desempenho Humano*, 12(5):352-358.

da Silva, V.M.F.; D`Affonseca Neto, J.A.; Mattos, G.E.; Sousa Lima, R.S. 2000. Duração da lactação em peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*): estudo de caso de filhote nascido em cativeiro. In: 9ª Reunión de trabajo de especialistas em mamíferos acuáticos de América Del sur. Buenos Aires, Argentina: SOLAMAC. p. 39.

da Silva, V.M.F.; Rosas, F.C.W.; Cantanhede, A.M. 2008. Peixe-boi da Amazônia, *Trichechus inunguis* (Natterer, 1883). In: Machado, A.B.M.; Drummond, G.M; Paglia, A.P. (Eds) *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Ministério do Meio Ambiente e Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, MG, BR. pp. 816-818.

Danil, K.; Robertson, K.M.; Chivers, S.J. 2004. *An evaluation of using enhanced digital microscopy to estimate ages of short-beaked common dolphins (Delphinus delphis)*. NOAA Technical Memorandum NMFS. National Marine Fisheries Service, NOAA, La Jolla, CA, USA. 32pp.

Davis, S.L.; Ohlson, D.L.; Klindt, J.; Anfinson, M.S. 1977. Episodic growth hormone secretory patterns in sheep: relationship to gonadal steroid hormones. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 233(6):E519-523.

Dawson, S.D. 2003. Patterns of ossification in the manus of the harbor porpoise (*Phocoena phocoena*): Hyperphalangy and delta-shaped bones. *Journal of Morphology*, 258:200-206.

Delaney, R.; Marsh, H. 1995. Estimating the Age of Wild Rock-wallabies by Dental Radiography: a Basis for Quantifying the Age Structure of a Discrete Colony of *Petrogale assimilis*. *Wildlife Resources*, 22:547-559.

Domning, D.P. 1982. Commercial exploitation of manatees *Trichechus* in Brazil c. 1785-1973. *Biological Conservation*, 22:101-126.

Domning, D.P. 2012. The Early Years of the Amazonian Manatee Project at INPA, Manaus, Brazil. *Aquatic Mammals*, 38(2):204-222.

- Domning, D.P.; Hayek, L.A.C. 1984. Horizontal tooth replacement in the Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*). *Mammalia*, 48:105–127.
- Domning, D.P.; Bufrénil, V. 1991. Hydrostasis in the sirenia: Quantitative data and functional interpretations. *Marine Mammal Science*, 7(4):331-361.
- Drost, W.T. 2002. Basic Ultrasound physics. *In.*: Thrall, D.E. (Ed) *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology*. Saunders, EUA. Ed. 4. 764 pp.
- Eklof, O. Ringertz, H. 1967. A method for assessment of skeletal maturity. *Annals of Radiology*, 10(3-4):330-336.
- Farhy, L.S.; Straume, M.; Johnson, M.L.; Kovatchev, B.; Veldhuis, J.D. 2001. A construct of interactive feedback control of the GH axis in the male. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 281:R38–R51.
- Fawcett, D.W. 1942. The amedullary bones of the Florida manatee (*Trichechus latirostris*). *American Journal of Anatomy*, 71(2):271-309.
- Fedak, T.J.; Hall, B.K. 2004. Perspectives on hyperphalangy: Patterns and processes. *Journal of Anatomy*, 204:151-163.
- Francisco, F.C.; Maymone, W.; Carvalho, A.C.P.; Francisco, V.F.M.; Francisco, M.C. 2005. Radiologia: 110 anos de história. *Revista Imagem*, 27(4):281-286.
- Galatius, A.; Andersen, M-B. E.R.; Haugan, B.; Langhoff, H.E.; Jespersen, A. 2006. Timing of epiphyseal development in the flipper skeleton of the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) as an indicator of paedomorphosis. *Acta Zoologica, Stockholm*, 87:77-82.
- Gheerbrant, E.; Domning, D.P.; Tassy, P. 2005. Paenungulata (Sirenia, Proboscidea, Hyracoidea, and relatives). *In.*: Rose, K.D.; Archibald, J.D. (Eds). *The rise of placental mammals: Origins and relationships of the major extant clades*. The Johns Hopkins University Press. Ed. 1. 280pp.
- Gehr, M.; Kraus, C.; Pilleri, G. 1982. The manus of *Pseudorca crassidens* (Owen): A study of variability. *Investigations on Cetacea*. 23:101-124.
- Gilsanz, V.; Ratib, O. 2005. *Hand Bone Age A Digital Atlas of Skeletal Maturity*. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, New York, NY, USA. 106pp.
- Gray, N-M.; Kainec, K.; Madar, S.; Tomko, L.; Wolfe, S. 2007. Sink or Swim? Bone Density as a Mechanism for Buoyancy Control in Early Cetaceans. *The Anatomical Record*, 290:638-653.
- Greulich, W.W.; Pyle, S.I. 1959. *Radiographic Atlas of Skeletal Development of the Hand and Wrist*. Stanford University Press, Palo Alto, CA, USA. 256pp.
- Guercio, G.; Rivarola, M.A.; Chaler, E.; Maceiras, M.; Belgorosky, A. 2003. Relationship between the growth Hormone/Insulin-like Growth Factor-I Axis, Insulin

sensitivity, and Adrenal Androgens in normal prepubertal and pubertal girls. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 88(3):1389-1393.

Guglielmini, C.; Zotti, A.; Bernardini, D.; Pietra, M.; Podestá, M.; Cozzi, B. 2002. Bone density of the arm and forearm as an age indicator in specimens of stranded striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *The Anatomical Record*, 267:225-230.

Guterres-Pazin, M.G.G. 2010. *Ecologia alimentar do Peixe-boi da Amazônia (Trichechus inunguis) (SIRENIA, TRICHECHIDAE) nas reservas de desenvolvimento sustentável Mamirauá e Amanã*. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas. 62pp.

Haiter Neto, F.; Almeida, S.M.; Leite, C.C. 2000. Estudo comparativo dos métodos de estimativas de idade óssea de Greulich & Pyle e Tanner & Whitehouse. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 14(4):378-384.

Hamada, Y.; Chatani, K.; Udono, T.; Kikuchi, Y.; Gunji, H. 2003. A longitudinal study on hand and wrist skeletal maturation in chimpanzees (*Pan troglodytes*), with emphasis on growth in linear dimensions. *Primates*, 44:259-271.

Harper, J.Y.; Samuelson, D.A.; Reep, R.I. 2005. Corneal vascularization in the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) and three-dimensional reconstruction of vessels. *Veterinary Ophthalmology*, 8:89-99.

Hautier, L.; Stansfield, F.J.; Allen, W.R.T.; Asher, R.J. 2012. Skeletal development in the African elephant and ossification timing in placental mammals. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 279:2188–2195.

Hickman, C.P.Jr; Roberts, L.S.; Larson, A. 2001. *Integrated principles of Zoology*. McGraw-Hill companies, New York, NY, USA. 918pp.

Hohn, A.A. 2008. Age estimation. In: Perrin, W.F.; Würsig, B.; Thewissen, J.G.M. (Eds). *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press, California, CA, USA. p. 11-17.

Howell, A.B. 1930. *Aquatic mammals: Their Adaptations to life in water*. Springfield, IL: Charles C. Thomas. 338 pp.

Hughes, P.C.R.; Tanner, J.M. 1970. The assessment of skeletal maturity in the growing rat. *Journal of Anatomy*, 106(2):371-402.

Hughes, P.C.R.; Tanner, J.M. 1973. A radiographic study of the growth of the rat pelvis. *Journal of Anatomy*, 114(3):439-448.

Hui, C.A. 1979. Correlates of maturity in the common dolphin, *Delphinus delphis*. *Fishery Bulletin*, 77:295-300.

Husar, S.L. 1977. *Trichechus inunguis*. *Mammalian species*, 72:1-4.

Ito, H.; Miyazaki, N. 1990. Skeletal development of the striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) in Japanese Waters. *Journal of Mammal Society of Japan*, 14:79-96.

IUCN. 2010. IUCN Red list of threatened species. Versão 2010.4. (<http://www.iucnredlist.org>). Acesso: 14/06/11.

Junk, W.J.; Da Silva, V.M.F. 1997. Mammals, reptiles and amphibians. In: Junk, W.J. (Ed.). *The central Amazon floodplain. Ecological Studies*, vol.126. Springer-Verlag, Berlin, DE. p. 409-411

Junqueira, L.C.; Carneiro, J. 2004. Hemocitopoese. In: Junqueira, L.C; Carneiro, J. (Eds). *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, SA. Ed. 10. 488pp.

Kähn, W. 1992. Ultrasonography as a diagnostic tool in female animal reproduction. *Animal Reproduction Science*, 28:1-10.

Kaiser, H.E. 1974. *Morphology of the Sirenia*. S. Karger. Basel, Switzerland.

Karaplis, A.C. 2008. Embryonic Development of Bone and regulation of intramembranous and endochondral bone formation. In: Bilezikian, J.P.; Raisz, L.G.; Martin, T.J. (Eds). *Principles of Bone Biology*. Vol.1. Academic Press. San Diego, CA, USA. p. 53-84.

Khade, N.B.; Patel, D.M.; Naikoo, M. 2011. Early pregnancy diagnosis using transrectal ultrasonography in Gir cattle. *Indian Journal of Field Veterinarians*, 7(1):43-46.

Klima, M.; Oelschläger, H.A.; Wünsch. 1980. Morphology of the pectoral girdle in the Amazon dolphin *Inia geoffrensis* with special reference to the shoulder joint and the movements of the flippers. *Sonderdruck aus Zeitschrift für Säugetierkunde*, 45(5):288-309.

König, H.E.; Liebich, H-G. *Anatomia dos Animais Domésticos: Texto e Atlas*. Porto Alegre: Artmed, Ed. 4. 2011. 788pp.

Lacave, G.; Eggermont, M.; Verslycke, T.; Brook, F.; Salbany, A.; Roque, L.; Kinoshita, R. 2004. Prediction from ultrasonographic measurements of the expected delivery date in two species of bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus* and *Tursiops aduncus*). *The Veterinary Record*, 154:228-233.

Maciel, G.C.; Da Silva, V.M.F. 2009. Avaliação do uso de costelas para estimativa de idade em peixes-bois. 61ª Reunião anual SBPC. Manaus, AM. Anais eletrônicos... (<http://www.spbcnet.org.br/livro/61ra/resumos/resumos/6908.htm>). Acesso: 14/06/11.

Marks, S.A.; Erickson, A.W. 1966. Age determination in the black bear. *Journal of Wildlife Management*, 30:389.

Marmontel, M.; Nhea, T.J.; Kochman, H.I.; Humphrey, S.R. 1996. Age estimation in manatees using growth-layer-group counts in bone. *Marine Mammal Science*, 12(1):54-88.

Marsh, H. 1980. Age Determination of the Dugong (*Dugong dugon* (Miller)) in Northern Australia and its Biological Implications. *Reports of IWC*, 3:181-201.

Marsh, H.; O'shea, T.J.; Best, R.C. 1986. Research on sirenians. *AMBIO*, 15(3):177-180.

Mellor, L.; Cooper, L.N.; Torre, J.; Brownell Jr, R.L. 2009. Paedomorphic ossification in porpoises with an emphasis on the vaquita (*Phocoena sinus*). *Aquatic Mammals*, 35(2):193-202.

Mentzel, H-J.; Vilser, C.; Eulenstein, M.; Scharz, T.; Vogt, S.; Böttcher, J.; Yaniv, I.; Tsoref, L.; Kauf, E.; Kaiser, W.A. 2005. Assessment of skeletal age at the wrist in children with a new ultrasound device. *Pediatric Radiology*, 35:429–433.

Nascimento, C.C.; Oliveira, C.A.; da Silva, V.M.F.; Felipe, E.C.G. D'Affonseca Neto, J.A. 2002. Estimativa do período de gestação em fêmeas do peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*), mantidas em cativeiro, com bases nos níveis plasmáticos de progesterona. In: *10ª Reunión de trabajo de especialistas em mamíferos acuáticos de América del Sur*. Valdivia, Chile: SOLAMAC. p. 41.

Odell, D.K. 1982. The West Indian manatee *Trichechus manatus*. In: Chapman & Feldhammer. *Wild mammals of North America biology, management and economics*. Hopkins University Press. pp. 828-837.

Ogden, J.A.; Conlogue, G.J.; Rhodin, A.G.J. 1981. Roentgenographic indicators of skeletal maturity in marine mammals (Cetacea). *Skeletal Radiology*, 7:119-123.

Olivete Junior, C.; Rodrigues, E.L.L. 2009. ER5 and ER3 – Bone age assessment by simplifications of the Eklof and Ringertz method. *Revista Odonto Ciência*, 24(4):361-366.

Olivete Junior, C. 2005. *Estimativa de idade óssea através da análise carpal baseada na simplificação do método Eklof & Ringertz*. Dissertação de mestrado. Escola de engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo. São Carlos, São Paulo. 112pp.

Pereira, A.P.E.; Dias, M.A.B.; Bastos, M.H.; Da Gama, S.G.N.; Leal, M.C. 2013. Determining gestational age for public health care users in Brazil: comparison of methods and algorithm creation. *BMC Research Notes*, 6:60.

Pough, F.H.; Janis, C.M.; Heiser, J.B. 2008. *A vida dos vertebrados*. Atheneu editora, São Paulo, SP, BR. 750pp.

Quiring, D.P.; Harlan, C.F., 1953. On the anatomy of the manatee. *Journal of Mammalogy*, 34:192-203.

Rihab, M.A.; Bushra, H.A.; Salah, M.A.; Mohamed, T.I. 2012. The accuracy of gestational age predicted from femur and humerus length in Saanen goats using ultrasonography. *Acta Vetrinaria (BRNO)*, 81:295-299.

Rodrigues, F.R. 2002. *Características Anatômicas e Histológicas do aparelho reprodutor feminino de Trichechus inunguis (Natterer, 1883) (Mammalia: Sirenia)*. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 114pp.

Rodrigues, F.R.; da Silva, V.M.F.; Barcellos, J.F.M.; Lazzarini, S.M. 2008. Reproductive anatomy of the female Amazonian Manatee *Trichechus inunguis* Natterer, 1883 (Mammalia: Sirenia). *The Anatomical record*, 291:557-564.

Rommel, A.; Lowenstine, L. 2001. Gross and microscopic anatomy. In: Dicrauf, L.A.; Gulland, F.M.D. (Eds). *CRC Handbook of marine mammal medicine: Health, disease, and rehabilitation*. CRC Press, Florida. 2 ed.

Ronald, K.; Selley, L.J.; Amoroso, E.C. 1978. Structure and function: part 1. In: Ronald, K.; Selley, L.J.; Amoroso, E.C. (Eds.) *Biological synopsis of the manatee*. The international development research centre, Ottawa, 112.p

Rosas, F.C.W. 1994. Biology, conservation and status of the Amazonian Manatee *Trichechus inunguis*. *Mammal Review*, 24:49-59.

Rosas, F.C.W.; Pimentel, T.L. 2001. Order Sirenia (Manatees, Dugongs, Sea Cows). In: Fowler, M.E.; Cubas, Z.S. (Eds). *Biology, Medicine, and surgery of south American wild animals*. Iowa State University Press/AMES, Iowa, IA, USA. p.352-362.

Roston, R.A.; Lickorish, D.; Buchholtz, E.A. 2013. Anatomy and Age Estimation of an Early Blue Whale (*Balaenoptera musculus*) Fetus. *The Anatomical Record*, 296:709–722.

Sannomiya, E.K.; Calles, A. 2005. Comparação da idade óssea com a cronológica em indivíduos portadores da síndrome de Down pelo índice de Eklöf & Ringertz, por meio de radiografias de mão e punho. *Ciência Odontológica Brasileira*, 8(2):39-44.

Sannomiya, K.E.; Medici Filho, E.; Castilho, J.C.M.; Graziosi, M.A.O.C. 1998. Avaliação da idade óssea em indivíduos portadores da síndrome de Down por meio de radiografias da mão e punho. *Revista de Odontologia da UNESP*, 27(2):527-536.

Santos Pinto, A. 2007. Entrevista. *Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial, Maringá*. 12(1):19-32.

Santos, M.C. de O.; Rosso, S.; Ramos, R.M.A. 2003. Age estimation of marine tucuxi dolphins (*Sotalia fluviatilis*) in south-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83:233-236.

Shah, S.; Teismann, N.; Zaia, B.; Vahidnia, F.; River, G.; Price, D.; Nagdev, A. 2010. Accuracy of emergency physicians using ultrasound to determine gestational age in pregnant women. *The American Journal of Emergency Medicine*. 28(7):834-838.

Sinclair, W.K. 2012. Cyclic X-Ray Responses in Mammalian Cells *in Vitro*. *Radiation Research*, 178(2):112-124.

Smith, R.N.; Allock, J. 1960. Epiphyseal fusion in the grey-hound. *Veterinary Records*, 72:75.

Stewart, R.E.A.; Stewart, B.E.; Stirling, I.; Street, E. 1996. Counts of growth layer groups in cementum and dentine in ringed seals (*Phoca hispida*). *Marine Mammal Science*. 12(3):383-401.

Tanner, J.M.; Healy, M.J.R.; Goldstein, H.; Cameron, N. *Assessment of skeletal maturity and prediction of adult height (TW3 Method)*. Ed. 3. W.B. Saunders. 2001.

Tanner, J.M.; Whitehouse, R.H. 1959. *Standarts for skeletal maturation*. Paris: international Children`s Center.

Vergara-Parente, J.E. 2009. *Estimativa de idade e crescimento de sirênios no Brasil*. Tese de doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco. 71p.

Vergara-Parente, J.E.; Parente, C.L.; Marmontel, M.; Silva, J.C.R.; Sá, F.B. 2010. Growth curve of free-ranging *Trichechus inunguis*. *Biota Neotropica*, 10(3):89-92.

Wagner UA, Diedrich V, Schmitt O. 1995. Determination of skeletal maturity by ultrasound: a preliminary report. *Skeletal Radiology*. 24:417–420.

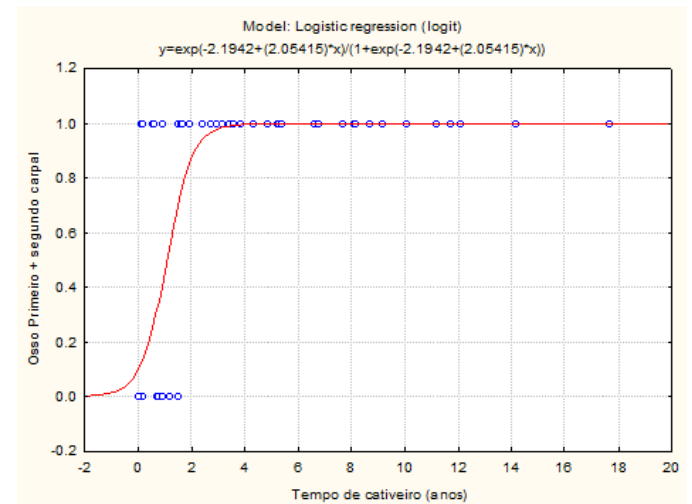
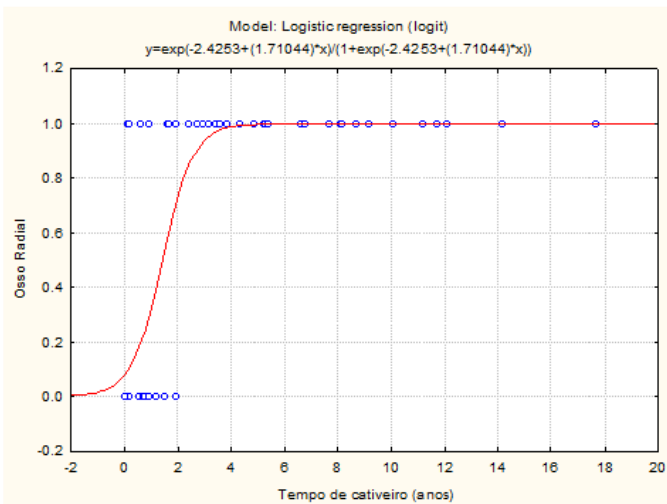
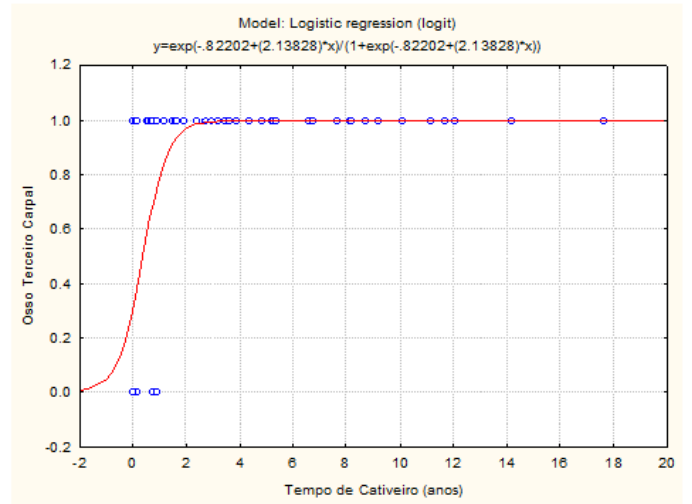
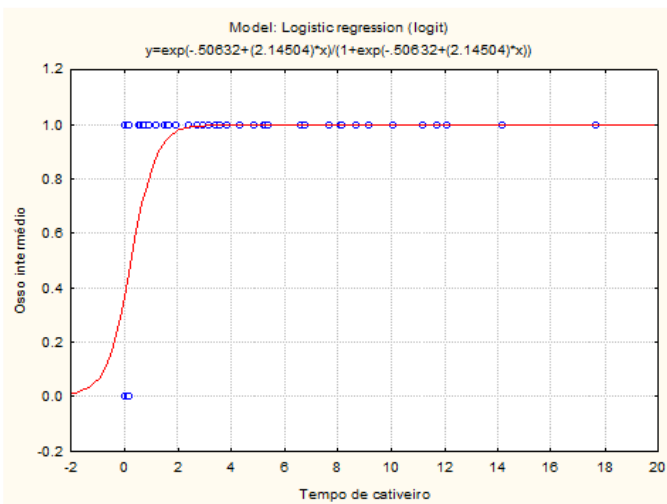
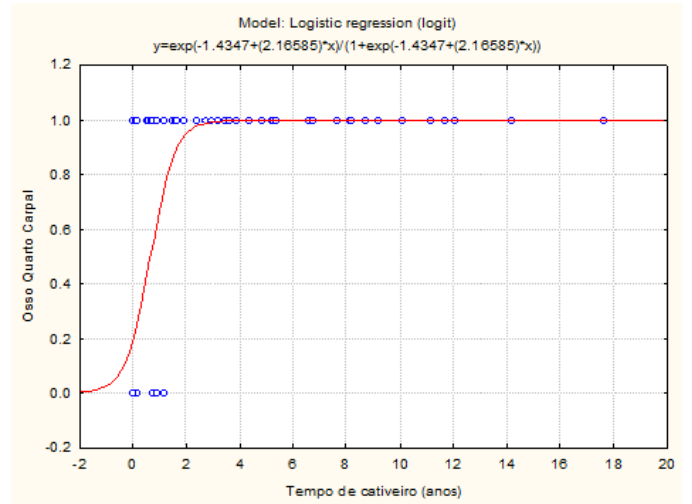
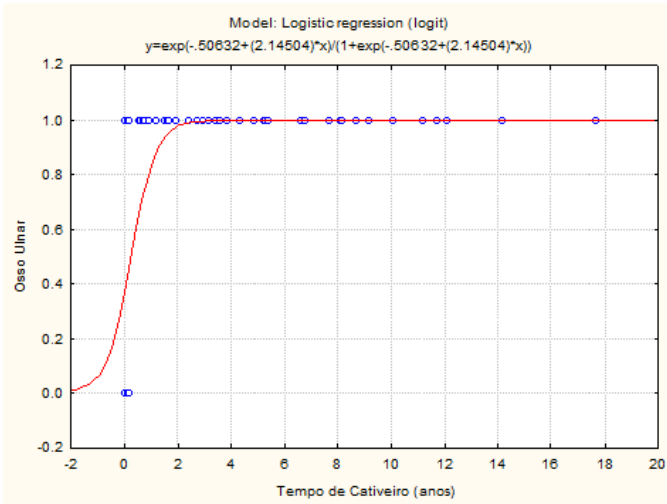
Wall, W.P. 1983. The Correlation between High Limb-Bone Density and Aquatic Habits in Recent Mammals. *Journal of Paleontology*, 57(2):197-207.

Windgate, T.; Todd, A.W. 1938. The epiphyseal union pattern of the ungulates with note on Sirenia. *American Journal of Anatomy*, 63(1):1-36.

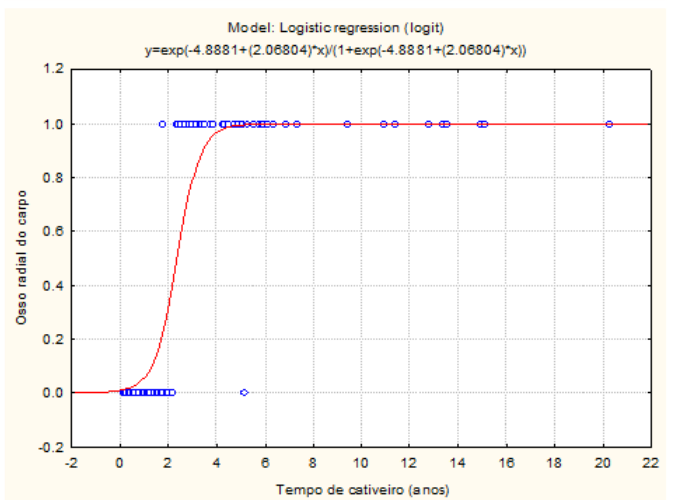
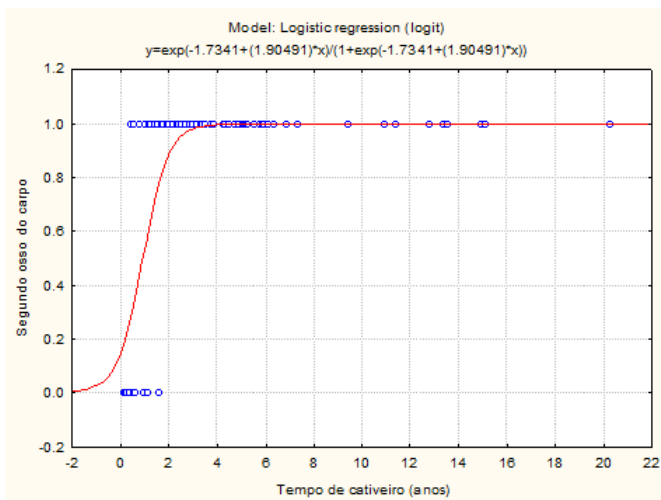
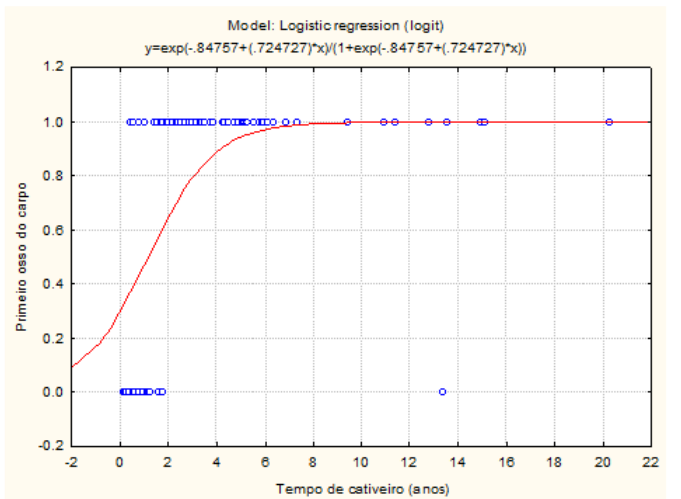
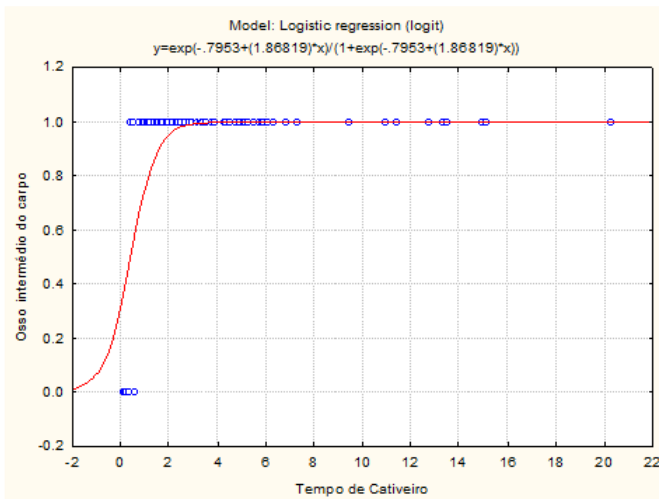
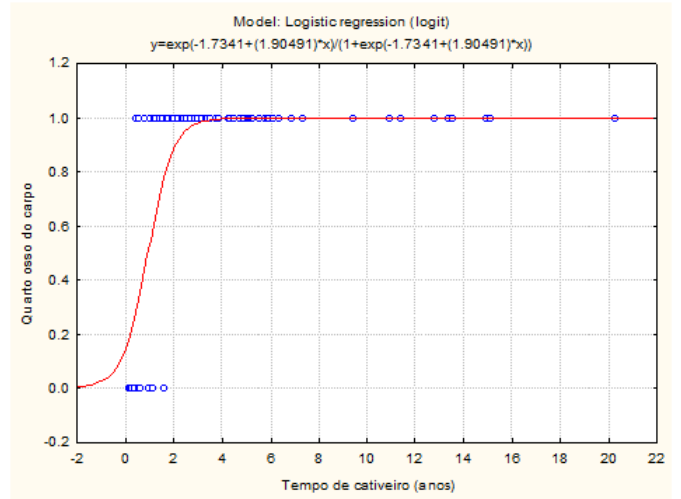
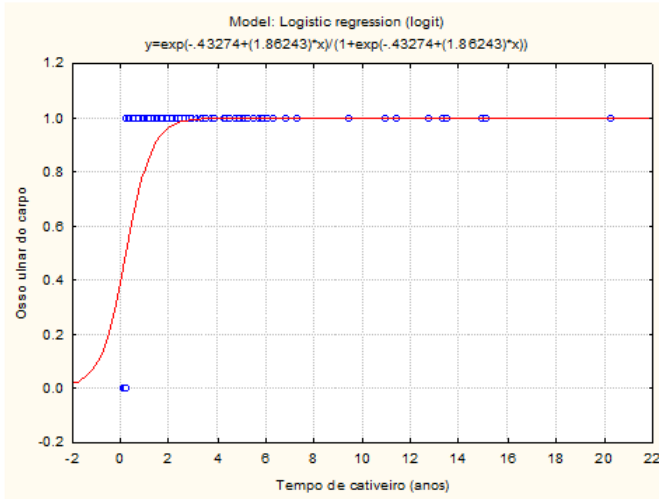
Wu, F.S-Y.; Hwu, Y-M.; Lee, R.K-K.; Li, S-H.; Sun, F-J.; Lin, M-H.; Lin, S-Y. 2012. First trimester ultrasound estimation of gestational age in pregnancies conceived after in vitro fertilization. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 160(2):151-155.



## Anexo I. Gráficos de regressão logística em ossos carpais de peixes-bois da Amazônia fêmeas



## Anexo II. Gráficos de regressão logística em ossos carpais de peixes-bois da Amazônia machos



**Anexo III – Atlas de desenvolvimento ósseo do peixe-boi da Amazônia fêmea.**



**Idade: A = 0 ano (recém nascido), B = Entre 0.5 – 1 ano**



**Idade: C = Entre 1 – 2 anos; D = Entre 2 – 3 anos.**



Idade: E = Entre 3 – 4 anos; F = Entre 4 – 6 anos.



Idade: G = Entre 6 – 9 anos; H = não determinado, maior do que 18 anos



**Anexo IV – Atlas de desenvolvimento ósseo do peixe-boi da Amazônia macho.**



**Idade: A = 0 ano (recém nascido); B = Entre 0.5 – 1 ano**



**Idade: C = Entre 1 – 2 anos; D = Entre 2 - 3 anos**



Idade: E = Entre 3 - 4 anos; F = Entre 4 - 6 anos



Idade: G = Entre 6 - 9 anos; H = não determinado, maior do que 20 anos



RESIDÊNCIA DA REPÚBLICA  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO  
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA  
ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS  
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

**PARECER CONSUBSTANCIADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO  
USO DE ANIMAIS**

Número do Protocolo: 064/2012	Data de Lançamento: 10/07/2012
Pesquisador Responsável: WINNIE MUNIZ BRUM	
Título do Projeto: "Desenvolvimento ósseo e estimativa de idade do Peixe-boi da Amazônia <i>Trichechus inunguis</i> (NATTERER, 1883) por avaliação radiográfica e ultrassonográfica"	
Instituição Responsável: INPA	

**INFORMAÇÕES SOBRE O MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL**

ESPÉCIE	LINHAGEM	IDADE	PESO APROX.	QUANTIDADE		
				M	F	M+F
<i>Trichechus inunguis</i>		0-10 anos			00	


**RECOMENDAÇÃO FINAL**

PROCESSO: 064/2012 de 10/07/2012

PROJETO: Desenvolvimento ósseo e estimativa de idade do Peixe-boi da Amazônia  
*Trichechus inunguis* (NATTERER, 1883) por avaliação radiográfica e  
ultrassonográfica

INDICAÇÃO: Aprovado

DATA DE LIBERAÇÃO DO PARECER: 04.04.2013

  
Dra. Vera M. F. da Silva  
Coordenadora: CRUA INPA