

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

Desenvolvimento embrionário e diferenciação gonadal de *Podocnemis unifilis* (Testudines: Podocnemididae) em temperatura controlada

MARIA FABIELE SILVA OLIVEIRA

Manaus, Amazonas
Março/2020

MARIA FABIELE SILVA OLIVEIRA

Desenvolvimento embrionário e diferenciação gonadal de *Podocnemis unifilis* (Testudines: Podocnemididae) em temperatura controlada

Orientador: Dr. Richard C. Vogt

Co-orientadora: Dra. Marcela dos Santos Magalhães - UFAM

Agência Financiadora: CAPES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia 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
Março/2020

BANCA EXAMINADORA

- Dra. Vera Maria Ferreira da Silva (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA)
Parecer: Aprovado

- Dr. José Fernando Marques Barcellos (Universidade Federal do Amazonas – UFAM)
Parecer: Aprovado

- Dr. Carlos Eduardo B. De Moura (Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA)
Parecer: Aprovado

O48d Oliveira, Maria Fabiele Silva
Desenvolvimento embrionário e diferenciação gonadal de *Podocnemis unifilis* (Testudines: Podocnemidae) em temperatura controlada / Maria Fabiele Silva Oliveira; orientador Richard Carl Vogt; coorientadora Marcela dos Santos Magalhães. - - Manaus: [s.l], 2020.
63 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) -- Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2020.

1. *Podocnemis unifilis*. 2. Tartaruga. 3. Embriogênese. 4. Gonadogênese. I. Vogt, Richard Carl, orient. II. Magalhães, Marcela dos Santos, coorient. III. Título.

CDD: 639.2

Dedico este trabalho aos meus pais Manoel e Zeni, meus maiores incentivadores e exemplos de determinação.

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda força e fé que me manteve firme para continuar e nunca desistir mesmo quando senti tanto medo e insegurança.

Aos meus pais, Manoel e Zeni por todo amor e incentivo, por me ensinarem a “voar” e correr atrás dos meus sonhos, por acreditarem em mim mais do que eu mesmo e por serem meu ninho, para onde sempre voltarei. Por entenderem minha ausência em tantos momentos da nossa família. Amo vocês!

Aos meus irmãos Francisco e Fábio, por nunca me deixarem esquecer que mesmo longe tenho vocês e que sempre seremos nos três, uns pelos outros. Que saudade!

A minha afilhada Sophia, por todo amor em cada mensagem e vídeos chamadas. Por entender minha ausência em quase todos seus aniversários, e por continuar me amando tanto. És meu amor, minha pequena!

As cunhadas Silvana e Nádila, por sempre cuidarem tão bem dos meus pais. E por acreditarem que eu conseguiria. É eu consegui!

As minhas tias Naza e Lene e minhas primas Caroline, Beatriz e Simone por terem torcido por mim desde o começo. Sinto muitas saudades!

Ao meu orientador Richard Vogt por acreditar na minha capacidade, aceitar me orientar, por ter me dado a liberdade de trabalhar com o que gosto e por ser sempre tão acessível todas as vezes que precisei.

A minha Coorientadora e amiga Marcela Magalhães por todas as horas de conversas, carinho, orientação em cada momento e oportunidade incrível de descobrir um mundo novo com a histologia. Obrigada por acreditar no meu potencial, por me ensinar cada coisa com tanto brilho nos olhos e por me mostrar como a gente pode ir além quando se ama o que faz. Se hoje sou uma profissional melhor, devo isso a você. Toda a minha admiração e respeito!

Ao Lucas Castanhola que tem um coração tão bom que nunca consegue dizer não. Obrigada pela amizade, por ter me acolhido e ser tão carinhoso, por me fazer rir quando as coisas davam errado com minhas lâminas e por me ensinar tanta coisa do mundo da microscopia.

A Layla Ianca por toda ajuda principalmente na reta final, por me ouvir desabafar, me fazer companhia até tarde da noite no laboratório e tornar esses momentos mais leves e agradáveis todas as vezes que cantava. Tens um coração puro e ter sua amizade é um presente. Conte sempre comigo!

Ao meu colega de casa e amigo de vida Danilo Barroso por cada momento dividido, cada conversa e desabafos cheios de saudades da família que sempre terminavam com esperança de que tudo valeria a pena. Obrigada por tudo que compartilhamos nesse período de convivência diária, que fortaleceu nossa amizade.

As minhas amigas e irmãs Tahuana e Yasmin por todo amor a mim dedicado nesses anos, por cuidarem de mim e do Joca sempre com tanto carinho. Obrigada por estarem comigo nos momentos bons e ruins. A amizade que construímos me fortaleceu e me fez acreditar ainda mais no quão sou capaz. Amo vocês!

A Ana Paula (Napaula) e Luigi Dieb que foram meus primeiros amigos quando cheguei em Manaus me dando todo suporte que precisei. Sem vocês tudo teria sido mais difícil.

As minhas amigas Eloyza e Jaqueline pelo carinho e por sempre comemorarem cada conquista minha.

Ao Henrique pela amizade leve e cheia de boas risadas que construímos, por cada abraço apertado pra me dizer que sempre estaria ali e que se orgulhava de mim e por jamais me deixar esquecer o quão forte sou.

Aos meus amigos Marcela, Jonatas e Thalison por serem os melhores vizinhos do mundo e tornarem meus dias mais felizes mesmo quando as coisas não estavam bem. A boa energia que emanam consegue acolher e aquecer um coração cheio de saudades de casa.

As minhas amigas Érica, Luiza, Janielle, Danielle, Tamires, Mariele e Hellem (Japa) que mesmo não estando presente fisicamente nos meus dias se fazem presente virtualmente, me dando forças e mostrando que a amizade sobrevive em meio a distâncias e rotina corrida.

Ao Cristiano Goes que chegou na minha vida na reta final do mestrado, o momento mais intenso e difícil e mesmo assim escolheu ficar ao meu lado, sempre dizendo que tudo daria certo. Obrigada por todas as vezes que me abraçou fazendo eu me sentir segura e por todos os bons cafés que já tomamos juntos. Tens meu carinho meu bem!

Ao meu filhote Joaquim por ser meu parceirinho e ter me enchido de amor felino todos os dias sem pedir muito em troca (só muita ração).

Ao Grupo de Pesquisa em Morfologia de Animais Silvestres (GPMAS) da Universidade Federal do Amazonas, por todo conhecimento compartilhado e experiências enriquecedoras. E meu agradecimento especial a Vanessa e Thayssa que me ajudaram por tantos dias no laboratório fazendo e refazendo minhas lâminas.

Aos meus amigos do Centro de Pesquisas dos Quelônios da Amazônia (CEQUA) por todas as boas conversas e por todas as vezes que se disponibilizaram a assistir minhas prévias. E meu agradecimento especial a Sabrina Menezes e Maria Augusta que sempre me trataram com tanto carinho.

Ao Laboratório Temático de Microscopia Eletrônica e Nanotecnologia (LTMN) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pelo suporte no processamento e análise em Microscopia de luz e Microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Dr. Paulo Andrade pelo apoio na realização da pesquisa possibilitando a coleta dos ovos de tracajá junto a sua equipe do programa Pé-de-pincha.

Ao professor Dr. Edinaldo Nelson e os seus alunos do Laboratório de Plâncton, que disponibilizaram a incubadora para a realização da incubação artificial dos ovos do experimento.

A minha turma de mestrado pelo companheirismo e experiências compartilhadas nesses dois anos de curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa do mestrado.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior (BADPI) e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pela estrutura e suporte necessário para realização dessa etapa tão importante da minha formação profissional.

A todos que não citei aqui, mas que de alguma forma contribuíram para esse trabalho dá certo e pro meu amadurecimento pessoal.

“Floresça onde Deus te plantar”

Autor desconhecido

ix

RESUMO

Esse trabalho objetivou descrever os caracteres morfológicos externos e diferenciação gonadal durante o desenvolvimento embrionário de *Podocnemis unifilis* em temperatura controlada. Foram coletados 100 ovos e incubados em incubadora artificial. O período de incubação foi de 60 dias, com temperatura média de incubação de 31,8°C. Foram realizadas análises macroscópicas, microscopia de luz e microscopia eletrônica por transmissão. As principais características utilizadas para descrição e comparação do desenvolvimento embrionário foram: cabeça, processo mandibular, olhos, membros, carapaça e plastrão. No desenvolvimento gonadal as células germinativas primordiais (CGPs) só foram visualizadas a partir do 7º dia de incubação, e se localizavam na região posterior do corpo do embrião e entre os dias 9 e 11 de incubação foi possível observar a migração das CGPs a partir do saco vitelínico em direção a região ventromedial da parede do mesonefro primitivo. Aos 20 dias de desenvolvimento a gônada indiferenciada está estabelecida sendo identificadas duas regiões distintas, a região cortical externa caracterizada pela presença de CGPs, e a região medular interna onde os cordões sexuais primitivos foram presentes. A diferenciação gonadal teve início a partir de 35 dias de incubação observando o início da organização dos cordões sexuais para a formação dos túbulos seminíferos. Todas as gônadas analisadas nesse estudo se diferenciaram formando testículos. Os estudos morfológicos do desenvolvimento embrionário e a caracterização gonadal geram informações acerca da biologia reprodutiva das espécies, e essas informações auxiliam em pesquisas para elaboração de estratégias de manejo e/ou tornando os métodos já existentes mais eficientes.

Palavras-chave: Embriologia, determinação sexual, quelônios.

ABSTRACT

This work aimed to describe the external morphological characters and gonadal differentiation during the embryonic development of *Podocnemis unifilis* at controlled temperature. 100 eggs were collected and incubated in an artificial incubator. The incubation period was 60 days, with an average incubation temperature of 31.8°C. Macroscopic analyzes, light microscopy and transmission electron microscopy were performed. The main characteristics used to describe and compare embryonic development were: head, mandibular process, eyes, limbs, carapace and plastron. In gonadal development, primordial germ cells (CGPs) were only visualized from the 7th day of incubation, and were located in the posterior region of the embryo's body and between the 9th and 11th incubation it was possible to observe the migration of the CGPs from the yolk sac towards the ventromedial region of the primitive mesonephral wall. At 20 days of development, the undifferentiated gonad is established and two distinct regions are identified, the external cortical region characterized by the presence of CGPs, and the internal medullary region where the primitive sexual cords were present. The gonadal differentiation started after 35 days of incubation observing the beginning of the organization of the sexual cords for the formation of the seminiferous tubules. All the gonads analyzed in this study differed, forming testicles. Morphological studies of embryonic development and gonadal characterization generate information about the reproductive biology of species, and this information helps in research to develop management strategies and / or making existing methods more efficient.

Key-words: Embryology, sex determination, turtles

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	1
<i>Descrição da espécie</i>	3
OBJETIVOS	5
<i>Objetivo geral</i>	5
<i>Objetivos específicos (por capítulos)</i>	5
CAPÍTULO I	13
CAPÍTULO II	38
ANEXOS	59

LISTA DE FIGURAS

GERAL

Figura 1.....	04
Figura 2	07

CAPÍTULO I

Figura 1.....	24
Figura 2.....	25
Figura 3.....	26

CAPÍTULO II

Figura 1.....	44
Figura 2.....	46
Figura 3.....	48
Figura 4.....	50
Figura 5.....	51

INTRODUÇÃO GERAL

Os quelônios constituem atualmente um dos grupos de vertebrados mais ameaçados do planeta, contendo cerca de 50% das espécies listadas em alguma categoria de ameaça de extinção ou que já foram extintas. O declínio das populações de quelônios está ligado principalmente à perda de habitats aquáticos e a sobre-exploração desses animais para fins diversos, destacando-se o uso como recurso medicinal, animais de estimação e recurso alimentar (Ferrara, *et al.*, 2017). Durante décadas na Amazônia, os quelônios têm sido caçados e seus ovos coletados, sendo a carne destes animais considerada uma iguaria na região (Ferrarini, 1980; Rebêlo & Pezzuti, 2000).

A predação de ovos e fêmeas de quelônios, mais suscetíveis no momento da desova, impossibilita incremento de novos indivíduos, o que contribui para um rápido declínio populacional, considerando que os quelônios apresentam grande longevidade e reprodução tardia como características de sua história de vida (Congdon *et al.*, 1993). A liberação do comércio de carne de quelônios provenientes de criadouros, não abrandou a pressão sobre os estoques naturais e foi ainda incapaz de substituir o comércio ilegal nos mercados locais (Rebêlo & Pezzuti, 2000). As espécies pertencentes à família Podocnemididae, *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-amazônia), *P. unifilis* (tracajá), *P. sextuberculata* (iaçá), *P. erythrocephala* (irapuca) e *Peltocephalus dumerilianus* (cabeçudo), são os quelônios mais consumidos da Amazônia (Pezzuti & Vogt, 1999).

A conservação das espécies de quelônios amazônicos é importante não apenas por manter a diversidade biológica neste bioma, mas também pelo papel histórico e atual destes animais como recurso alimentar e fonte de proteína para as populações ribeirinhas (Vogt, 1994). Diante disso, muitos métodos têm sido utilizados como medidas de manejo para a conservação de quelônios com intuito de manter, aumentar e/ou recuperar populações em declínio. Sendo elas divididas em *in situ*: consistem em proteger o habitat e os animais ou restabelecer o habitat, por meio de leis de proteção, controle de predadores e proteção de áreas de desova; e *ex situ*: ações como a remoção dos ovos do local que foram desovados e a transferência para local protegido, criação de animais em viveiros e *headstarting* (manter filhotes recém-nascidos em viveiros, com o objetivo de permitir o crescimento dos mesmos até um tamanho em que estejam menos vulneráveis a predadores) (Vismara, 2010).

Projetos de proteção e manejo de quelônios são desenvolvidos em diversas áreas no Brasil, e quando consideramos os de água doce, incluem-se especialmente as espécies do

gênero *Podocnemis* (Ataídes, 2009). Entretanto, para o desenvolvimento eficiente dos métodos de conservação dos quelônios amazônicos, é necessário um conhecimento acerca da biologia reprodutiva, bem como da influência da temperatura no desenvolvimento e diferenciação gonadal das espécies (Souza & Vogt, 1994).

A temperatura é o elemento principal da determinação sexual de inúmeras espécies de tartarugas (Ferreira Júnior, 2009), além de fatores como umidade e as trocas gasosas (Mrosovsky & Yntema, 1981). Espécies que apresentam a determinação sexual dependente da temperatura (TSD) possuem um período durante a incubação dos ovos onde o embrião é sensível à temperatura do ambiente, e é nesse intervalo de tempo denominado de período termossensível (TSP) que a diferenciação do sexo do indivíduo é definido.

Somente durante o período termossensível é que pode ocorrer a diferenciação sexual dos embriões, ou seja, a temperatura mais importante durante o processo de incubação é a que for sentida pelos embriões durante o TSP. E as mudanças de temperaturas experimentadas antes e depois desse período pode afetar a taxa de desenvolvimento embrionário, mas não exercerá influência sobre a diferenciação gonadal dos embriões (Bull, 1980; Yntema & Mrosovsky, 1982; Bull, 1983; Ferreira Júnior, 2009). A temperatura de incubação influencia também a duração da incubação e o grau de desenvolvimento do embrião, e muitos tecidos e órgãos podem mostrar diferentes respostas em relação à temperatura de incubação (Billet *et al.*, 1985).

Os trabalhos sobre desenvolvimento embrionário de quelônios trazem importantes informações relacionadas às mudanças externas do embrião, onde são descritas as características que os caracteres morfológicos das espécies apresentam durante seu desenvolvimento (Yntema, 1968; Crastz, 1982; Guzman & Bonilla, 1990; Kaska & Downie, 1999; Beggs *et al.*, 2000; Tokita & Kuratani, 2001; Greenbaum, 2002; Werneburg *et al.*, 2009; Okata *et al.*, 2011; Cordero & Janzen, 2014; Braga, 2016). No entanto, pesquisas voltadas para descrição do desenvolvimento embrionário de espécies de quelônios na Amazônia são restritas a *P. unifilis* (Guzman & Bonilla, 1990) e *P. expansa* (Hildebrand *et al.*, 1997; Magalhães *et al.*, 2017).

Pesquisas relacionadas à influência da temperatura na determinação do sexo e a biologia reprodutiva de quelônios tem sido mais frequentes (Yntema, 1976; Yntema & Mrosovsky, 1980; Rimblot, *et al.*, 1985; Merchant-Larios *et al.*, 1989; Salame-Méndez, 1998;

Greenbaum & Carr, 2001), no entanto trabalhos com gonadogênese para espécies amazônicas se restringe a pesquisas com *P. expansa* (Hildebrand *et al.*, 1997 e Magalhães, 2017).

Os estudos morfológicos do desenvolvimento embrionário e caracterização gonadal são ferramentas que auxiliam em pesquisas para elaboração de estratégias de manejo, incluindo transplantes de ninho e programas de incubação seminatural (Hildebrand, *et al.*, 1997).

Descrição da espécie

Estando entre as espécies mais comuns na Amazônia, *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848), conhecida popularmente como tracajá, ocorre em todos os estados do Brasil que fazem parte da bacia Amazônica (Amazonas, Roraima, Rondônia, Mato Grosso, Pará e Amapá) e vivem em uma variedade de habitats, tais como lagos, grandes rios, lagos de meandro, pântanos, brejos e lagoas (Ferrara *et al.*, 2017). Quando os rios transbordam (durante a estação chuvosa) essa espécie procura refúgio das águas turbulentas e migram para ambientes aquáticos calmos, como lagos e florestas inundadas (Pritchard & Trebbau, 1984).

O tracajá é uma das espécies mais consumidas da Amazônia, sendo atualmente a mais procurada e consumida no médio e baixo rio Jaú, cidades de Novo Airão e Manaus (localizadas na bacia do rio Negro), levando a sobre-exploração de adultos, juvenis e ovos para consumo e venda nos mercados (Rebêlo & Pezzuti, 2000). Assim como a maioria das espécies de quelônios, o tracajá é um animal que apresenta maturação sexual tardia e, por isso, uma baixa taxa de renovação de indivíduos (Alfinito, 1973; Pritchard, 1979). Apesar de apresentarem baixa mortalidade de indivíduos adultos, possuem altas taxas de perda de ovos e filhotes (Ernst & Barbour, 1989; IBAMA, 1989).

Como características específicas a espécie possui apenas um barbelo sob o maxilar (o que dá o nome da espécie “*unifilis*”), mas esse caracter pode variar e são encontrados indivíduos com o padrão do gênero com dois barbelos (Rueda-Almonacid *et al.*, 2007); e manchas amarelas na cabeça nos filhotes e machos adultos (Figura 1), enquanto que as fêmeas adultas perdem a coloração, apresentando a cabeça marrom-escuro (Ferrara *et al.*, 2017). As fêmeas adultas da espécie medem entre 350 a 500 mm e os machos entre 250 a 390 mm. São animais de grande importância para os ecossistemas aquáticos e com sua importância nas teias tróficas por atuarem como consumidores herbívoros, de plantas aquáticas, algas, sementes, folhas, frutos, flores, raízes, insetos e moluscos, e são utilizados como recurso alimentares para jacarés, aves e outros animais (Portal *et al.*, 2002; Vogt, 2008).



Figura 1: exemplares da espécie *Podocnemis unifilis*. a) filhote de *P. unifilis*; b) macho adulto de *P. unifilis*. Fonte: Otávio Lino (acervo pessoal).

P. unifilis é uma espécie menos seletiva que a *Podocnemis expansa*, e pode desovar em praias de areia, em lama semi-seca e barrancos às margens dos rios, lagos e paranás (Fachín- Terán & Von Mühlhen, 2006). A nidificação de *P. unifilis* está relacionada ao ciclo anual de vazante e enchente, sendo que a desova e a incubação são realizadas na época da seca, e o nascimento dos filhotes coincide com o início da enchente (Thorbjarnarson *et al.*, 1993; Fachín-Terán & Von Mühlhen, 2006). A espécie deposita de 11 a 35 ovos em cada desova e o período de incubação dos ovos dura cerca de 45 a 70 dias, estando essa variação relacionada ao local/substrato de desova (Vogt, 2008).

Estudos voltados para a ecologia reprodutiva evidenciaram que filhotes de *P.unifilis* apresentam determinação sexual dependente da temperatura durante a incubação dos ovos (TSD), estando o predomínio de fêmeas ligado a temperaturas mais altas, e a maior quantidade de machos quando os ovos são incubados em temperaturas mais baixas (Souza & Vogt, 1994). A temperatura de 32°C foi considerada a pivotal para a incubação da espécie em ninhos com temperaturas constantes (Souza & Vogt, 1994), ou seja, temperatura que possibilita o desenvolvimento de 50% de chance dos embriões serem machos e 50% fêmeas. No entanto, pequenas variações em torno dessa temperatura podem afetar a determinação sexual dos embriões (Bull, 1980; Ferreira Júnior, 2009).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Descrever o desenvolvimento embrionário e caracterizar o desenvolvimento e a diferenciação gonadal de *Podocnemis unifilis* em temperatura controlada.

Objetivos específicos (por capítulos)

Capítulo I: Descrever macroscopicamente o desenvolvimento dos caracteres morfológicos externos de *P. unifilis* durante o período embrionário em temperatura controlada.

Capítulo II: Descrever morfológicamente o desenvolvimento e a diferenciação gonadal ao longo do período de incubação de *P. unifilis* em temperatura controlada.

DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

O estudo foi aprovado pelo Sistema de Informações e Autorização de Biodiversidade (SISBIO) nº 39472-9 do Instituto de Conservação da Biodiversidade Chico Mendes (ICMBio) / Ministério do Meio Ambiente (MMA), e os procedimentos laboratoriais envolvendo os animais estão de acordo com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), sob número de registro: nº 050/2018.

ÁREA DE COLETA

A cidade de Barreirinha – AM (2° 44' 49"S e 42° 49' 33"W) está localizada na margem direita do rio Andirá, afluente da região do Baixo Amazonas, possui território é rico em fauna e flora, além de ser um município amazonense que possui a área indígena Sateré - Maué preservada (Silva, 2013). Limita-se ao norte com os municípios amazonenses de Parintins e Urucurituba; ao sul, com o Estado do Pará; a leste, também com Parintins, a oeste com as cidades de Boa Vista do Ramos e Maués. Barreirinha localiza-se a 49 km de Parintins e 512 km de Manaus. O rio Andirá possui águas pretas e contorna grande parte do município de Barreirinha, as praias que se formam no verão, servem como os principais pontos turísticos do município. Na região do médio e baixo Amazonas foram identificadas 13 espécies de quelônios. Dentre estas estão às cinco espécies pertencentes à família Podocnemididae: tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa*), tracajá (*P. unifilis*), iacá (*P. sextuberculata*), irapuca (*P. erythrocephala*) e cabeçudo (*Peltocephalus dumerilianus*). Sendo estas as

principais espécies protegidas pelos comunitários em ação com o projeto Pé-de-Pincha (Andrade, *et al.*, 2012; Andrade, *et al.*, 2015).

COLETA DOS OVOS

Os ovos foram coletados em outubro de 2018 em parceria com a equipe do Projeto Pé-de-Pincha, na comunidade Granja Ceres (2° 53' 08"S e 57° 03' 34"W), onde o monitoramento das populações de quelônios pelo projeto Pé-de-Pincha foi iniciado em 2004 (Andrade, *et al.*, 2012). Após a identificação do ninho de desova recente de *P. unifilis*, os ovos foram retirados do ninho, identificados de acordo com o ninho coletado e armazenados em caixas de isopor de 17 litros contendo areia da praia de desova, para evitar que ocorresse movimentação em excesso dos ovos dentro da caixa durante o transporte. Foram coletados e transportados até a cidade de Manaus um total de 100 ovos de *P. unifilis* para a realização do estudo (SISBIO n° 39472-9).

INCUBAÇÃO

O processo de incubação foi realizado em uma incubadora artificial (B.O.D - 342L[®]) (Figura 2A) na Sala de Cultivo de Plâncton do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA. Em recipientes plásticos foi adicionado substrato para incubação (vermiculita) umedecido na concentração de 1:1 (1 litro d'água pra 1 kg de vermiculita), posteriormente era retirado o excesso de água (Figura 2B) e os ovos foram distribuídos de forma aleatória nos recipientes que comportavam entre seis e sete ovos (Figura 2C). A vermiculita foi utilizada como substrato de incubação por apresentar elevado poder de retenção hídrica e mantém por muito mais tempo a umidade local (Guimarães, *et al.*, 2017) e por sua eficiência da técnica de incubação artificial de ovos de outros reptéis (Durval, *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2016).

Os ovos foram dispostos na mesma posição em que se encontravam no ninho, sendo está posição também mantida durante o transporte até Manaus. A temperatura usada para a incubação dos ovos foi de 32°C. Porém, durante todo o período de incubação, foram registrados de hora em hora, os dados da temperatura interna da incubadora por meio de sensor remoto de temperatura, Hobo data loggers (Onset[™] Computer Corporation), para avaliar as possíveis variações de temperatura durante o experimento. Para manter a umidade no interior da incubadora, foram utilizadas quatro placas de Petri abastecidas com água. O controle de umidade foi feito por um higrômetro interno, e quando necessário era realizava-se

a pulverização de água sobre o substrato em que os ovos estavam incubados, além do reabastecimento constante das quatro placas de Petri com água.



Figura 2: Incubação dos ovos de *Podocnemis unifilis*. a) incubadora artificial, b) retirada do excesso de água da vermiculita, c) ovos no recipiente contendo vermiculita.

REFERÊNCIAS

- ALFINITO, J. (1973) Fundamentos ao serviço de proteção à tartaruga. Preservação da tartaruga da Amazônia. Ministério da Agricultura. DEMA/ PA, IBDF, Belém (PA), p. 1-36.
- ANDRADE, P.C.M. *et al.*, (2012) Crescimento, taxa de sobrevivência e tabelas de vida de tracajás (*Podocnemis unifilis*) em áreas de manejo comunitário no médio Amazonas. In: ANDRADE, P.C.M. (Org.). Manejo Comunitário de Quelônios no Médio Amazonas e Juruá – Projeto Pé-de-Pinha. Manaus: Gráfica Moderna, Cap. 11, p. 507-540.
- ANDRADE, P.C.M. *et al.*, (2015) Quelônios e sua importância para os ribeirinhos da Amazônia In: ANDRADE, P.C.M. (Org.). Projeto Pé-de-Pinha: Conservação e Manejo de Quelônios – Manual para Gestores Ambientais. Manaus: UNISOL/UFAM, Cap. 1, p. 15-46.
- ATAÍDES, A. G. (2009) Parâmetros populacionais, aspectos reprodutivos e importância socioeconômica de *Podocnemis unifilis* (TROSCHER, 1848) (Testudines, Podocnemididae), no entorno do Parque Nacional do Araguaia, Tocantins. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Tocantins, Palmas.
- BEGGS K, YOUNG J, GEORGES A, WEST P (2000) Ageing the eggs and embryos of the pig-nosed turtle, *Carettochelys insculpta* (Chelonia: Carettochelydidae), from northern Australia. *Can J Zool* 78:373–392
- BILLET F, GANS C, MADERSON PFA (1985) Why study reptilian development. In: Billet F, Maderson PFA (eds) *Biology of the Reptilia*. John Wiley & Sons, New York, v. 14, pp 1–25
- BULL, J. J. (1980) Sex determination in reptiles. *Quart Rev Biol*, 55:3-21.
- BULL, J. J. (1983) *Evolution of Sex Determining Mechanisms*. Benjamin: Cummings, Menlo Park, CA.
- BRAGA B. E. S. (2016) Desenvolvimento embrionário de *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) (Chelonia: Kinosternidae): ontogênese das gônadas masculina e feminina. Universidade Federal do Pará.
- CORDERO, G. A.; JANZEN, F. J. (2014) An Enhanced Developmental Staging Table for the Painted Turtle, *Chrysemys picta* (Testudines: Emydidae). *JOURNAL OF MORPHOLOGY* 275:442–455.

- CONGDON, J. D.; DUNHAM, A. E.; VAN LOBEN SELS, R. C. (1993) Delayed Sexual Maturity and Demographics of Blanding's turtles (*Emydoidea, blandingii*): implications for conservation and management of long-lived organisms. *Conservation Biology*, 7(4): 826-833.
- CRASTZ, F. (1982) Embryological stages of the marine turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz). *RevBiolTrop*30:113–120.
- ERNST, C. H.; BARBOUR, R. W. (1989) *Turtles of the World*. Washington, Smithsonian Institution Press. 313 pp.
- FACHÍN-TERÁN, A.; VON MÜLHEN, E. M. (2006) Período de desova e sucesso reprodutivo do tracajá *Podocnemis unifilis* TROSCHEL 1848 (Testudines: Podocnemididae) na várzea da RDSM médio Solimões, BRASIL. UAKARI.
- FERRARA, C. R.; FAGUNDES, C. K.; MORCATTY, T. Q.; VOGT, R. C. (2017). *Quelônios Amazônicos: Guia de identificação e distribuição*. Manaus, WCS.
- FERRARINI, S.A. *Quelônios: animais em extinção*. Manaus, Falangola, 1980.
- FERREIRA JÚNIOR, P. D. (2009) Aspectos Ecológicos da Determinação Sexual em Tartarugas. *Acta Amazonica*, vol. 39(1): 139 – 154.
- GUZMAN, N. A. B.; BONILLA, H. (1990) O Serie normal del desarrollo morfológico embrionario de *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) (Testudinata, Pelomedusidae). *Acta Biologica Colombiana*. Vol. 2, N° 6:129-150.
- GREENBAUM, E.; CARR, J. L. (2001) Sexual Differentiation in the Spiny Softshell Turtle (*Apalonespinifera*), a Species With Genetic Sex Determination. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY*, 290:190–200.
- GREENBAUM, E (2002) A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta*. *Can J Zool*80:1350–1370
- HILDEBRAND, P. V.; BERMUDEZ, N.; PEÑUELA, M. C. (1997) *La Tortuga Charapa (Podocnemis expansa) em el bajo rio Caquetamazonas, Colombia: Aspectos de la Biología reproductiva y Tecnicas para sua manejo*. Colombia: Disloque Editora. 1ª ed.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (1989) *Projeto Quelônios da Amazônia 10 anos*. Brasília. 119 p.
- KASKA Y, DOWNIE R. (1999) Embryological development of sea turtles (*Chelonia mydas*, *Caretta caretta*) in the Mediterranean. *Zool Middle East*, 19(1):55-69.

- MAGALHÃES, M. S. (2017) Desenvolvimento embrionário de *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae): descrição do pronefro e mesonefro e diferenciação gonadal em ambiente natural, Balbina, Amazonas. Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus.
- MAGALHÃES, M. S. *et al.*, (2017). Embryonic development of the Giant South American RiverTurtle, *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae). *Zoomorphology* 136:523–537
- MARQUES, E. G.; GOLÇALVES, L. S.; RODRIGUES, V. S.; MUNIZ, C. M. S. (2016) Caracterização da agricultura familiar e da pesca no distrito da freguesia do Andirá, município de Barreirinha AM. XVIII Encontro Nacional de Geógrafos. A Construção do Brasil: geografia, ação política e democracia. ISBN: 9788599907078. São Luís, MA.
- MERCHANT-LARIOS, H.; FIERRO, I. V.; URRUIZA, B. C. (1989) Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpetological Monographs*, 3:43-61.
- MROSOVSKY N, YNTEMA CL. (1981) Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: implications for conservation practices. In Bjorndal KA (Ed.). *Biology and Conservation of Sea Turtles*. Smithsonian Inst. Press in coop. World Wildlife Fund, Inc. Washington, D.C.
- OKADA, Y; YABE, T; ODA, SI. (2011) Embryonic Development of the Japanese Pond Turtle, *Mauremys japonica* (Testudines: Geoemydidae). *Current Herpetology* 30(2): 89–102,
- PEZZUTI, J. C. B.; VOGT, R. C. (1999) Nesting ecology of *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Pelomedusidae) in the Japurá River, Amazonas, Brazil. *Chel Conserv Biol.*, 3(3):419-424.
- PRITCHARD, P. C. H. (1979) *Encyclopedia of Turtles*. T.F.H. Publ. Inc., Neptune, New Jersey. 859 pp.
- PRITCHARD, P. C. H.; TREBBAU, P. (1984) *The turtles of Venezuela*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, v.1, 403p.
- PORTAL, R. R.; *et al.*, (2002) Espécies vegetais utilizadas na alimentação de *podocnemis unifilis*, Troschel 1948 (reptília, testudinae, pelomedusidae) na região do pracuúba - Amapá-Brasil. *Ciência Animal Brasileira* 3(1): 11-19.

- REBÊLO, G.; PEZZUTI, J. (2000) Percepções sobre o consumo de quelônios na Amazônia. Sustentabilidade e alternativas ao manejo atual. Ambiente & Sociedade - Ano III - No 6/7.
- RIMBLOT, F.; FRETEY, J.; MROSOVSKY, N.; LESCURE, J.; PIEAU, C. (1985) Sexual differentiation as a function of the incubation temperature of eggs in the sea-turtle *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1761). *Amphibia-Reptilia* 6: 83-92.
- RUEDA-ALMONACID, J. V.; *et al.*, (2007) *Las tortugas y los crocodilianos de los países andinos del trópico*. Serie de guías tropicales de campo n° 6. Conservación Internacional. Editorial Panamericana, Bogotá, Colombia, 538p.
- SALAME-MÉNDEZ, (1998) A. Influencia de la Temperatura de Incubación em la Determinación del Sexo em Quelonios. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 48:125-136, SILVA, A. N. Memórias de Barreirinha. INTERCOM – Sociedade Brasileira de Estudos Interdisciplinares da Comunicação. XX Prêmio Expocom, 2013.
- SOUZA, R. R.; VOGT, R. C. (1994) Incubation temperature influences sex and hatchling size in the Neotropical turtle *Podocnemis unifilis*. *Journal of Herpetology*, 28(4):453-464.
- THORBJARNARSON, J. B.; PEREZ, N.; ESCALONA, T. (2007) Nesting of *Podocnemis unifilis* in the Capanaparo River, Venezuela. *Journal of Herpetology*, Vol. 27, No. 3. (Sep., 1993), pp. 344-347.
- TOKITA, M.; KURATANI, S. (2001) Normal embryonic stages of the Chinese softshelled turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae). *ZOOLOGICAL SCIENCE* 18(5): 705-715.
- VISMARA, M. R. (2010) Influência do manejo de ninhos de *Podocnemis unifilis* sobre o desenvolvimento de embriões no Lago Erepecu, REBIO - Trombetas (PA). Dissertação (mestrado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus.
- VOGT, R. C. (1994) Temperature controlled sex determination as a tool for turtle conservation. *Chelonian Conservation and Biology*, 1(2):159-162.
- VOGT, R. C. (2008) Tartarugas da Amazônia. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, AMAZON Conservation Association.
- WERNEBURG I, HUGI J, MULLER J, SÁNCHEZ-VILLAGRA MR (2009) Embryogenesis and ossification of *Emydura subglobosa* (Testudines, Pleurodira, Chelidae) and patterns of turtle development. *Dev Dynam* 238:2770–2786

- YNTEMA CL (1968) A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. J Morphol 125:219–251
- YNTEMA, C. L. (1976) Effects of incubation temperatures on sexual differentiation in the turtle, *Chelydraserpentina*. J Morphol 150:453-461.
- YNTEMA, C. L.; MROSOVSKY, N. (1980) Sexual Differentiation in Hatchling Loggerheads (*Carettacaretta*) Incubated at Different Controlled Temperatures. Herpetologica, Vol. 36, N°. 1: 33-36.
- YNTEMA, C. L.; MROSOVSKY, N. (1982) Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead turtles. Canadian Journal of Zoology, 60:1012-1016.

Capítulo I

Desenvolvimento embrionário de *Podocnemis unifilis* (Testudines:
Podocnemididae) em temperatura controlada

TÍTULO

Desenvolvimento embrionário de *Podocnemis unifilis* (Testudines: Podocnemididae) em temperatura controlada

AUTORES

Maria Fabiele S. Oliveira¹, Richard C. Vogt², Lucas Castanhola Dias,³ Marcela S. Magalhães⁴

¹Mestranda em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil.

²Centro de Estudos dos Quelônios da Amazônia, Coordenação de Biodiversidade, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil.

³Laboratório Temático de Microscopia Eletrônica e Nanotecnologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil.

⁴Departamento de Morfologia, Laboratório de Histologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

RESUMO

Obter informações sobre a embriologia básica de espécies de quelônios é uma importante contribuição na conservação das espécies, manejo e efeitos da intervenção humana sobre os ninhos. Cem ovos de *Podocnemis unifilis* foram coletados e incubados artificialmente com temperatura de 32°C. Os embriões eram coletados diariamente e estes fixados em Bouin para análise macroscópica. O período de incubação durou 60 dias. As principais características utilizadas para descrição e comparação do desenvolvimento embrionário foram: desenvolvimento da cabeça, olhos, processo mandibular, membros, carapaça e plastrão. Para a descrição do desenvolvimento foi usado o Standard Event System (SES). O aparecimento das estruturas foi semelhante ao que tem descrito para *P. expansa*, no entanto se comparado a outras espécies, *P. unifilis* apresentou desenvolvimento das estruturas de forma mais acelerada. Dados de tabelas de desenvolvimento são importantes para estudos de origem e evolução de mudanças morfológicas nos grandes grupos filogenéticos.

Palavras-chave: Embriologia, caracteres morfológicos, tracajá

INTRODUÇÃO

Existe uma vertente na área do desenvolvimento embrionário que propõe que os vertebrados passam por um estágio embriológico idêntico ou conservado chamado de “estágio filotípico” (Butler & Juurlink 1987; Wolpert, 1991; Alberts *et al.*, 1994; Collins, 1995). Autores afirmam que as características específicas que diferenciam os vertebrados são decorrentes das modificações que surgem em estágios tardios do desenvolvimento, já próximo do período de nascimento do indivíduo (Slack *et al.*, 1993; Alberts *et al.*, 1994; Duboule, 1994; Ricklefs & Starck, 1998).

As primeiras publicações voltadas para descrições embrionárias de tartarugas foram feitas por Rathke (1848), Agassiz (1857) e Parker (1880). Yntema (1968) para *Chelydra serpentina* padronizou em uma tabela de 26 estádios do desenvolvimento embrionário, no qual tem como base as mudanças morfológicas externas iniciais e as alterações físicas que os animais sofrem no decorrer do desenvolvimento embrionário. Essa tabela padrão foi utilizada por diversos autores para a descrição do estadiamento de outras espécies de quelônios (Packard *et al.*, 1977; Crastz, 1982; Miller, 1985; Guzman & Bonilla, 1990; Beggs *et al.*, 2000; Tokita & Kuratani, 2001; Greenbaum, 2002; Greenbaum & Carr, 2002; Okada *et al.*, 2011; Cordero & Janzen, 2014; Braga, 2016; Magalhães *et al.*, 2017).

Para a determinação dos estádios de desenvolvimento para quelônios, deve ser levado em consideração os registros de características morfológicas específicas associadas a temperatura em que estão expostos durante a embriogênese (Braga, 2016). No entanto, as tabelas usualmente utilizadas como referência para o desenvolvimento embrionário desconsideram as informações sobre a variabilidade intraespecífica (Werneburg, 2009). Diante disso, Werneburg (2009) desenvolveu um sistema intitulado Standard Event System (SES), que impede a simplificação na descrição do desenvolvimento embrionário quando comparado as demais tabelas anteriormente descritas, pois é visto que em muitos casos a descrição do desenvolvimento de uma espécie é restrito apenas a comparação de alguns caracteres morfológicos, deixando assim de ser descrito características específicas da espécie, como padrão de coloração por exemplo. Tipologias e simplificação são vistas em muitas tabelas de estadiamento, mas o sistema de Werneburg (2009) inclui uma extensa lista de referência capaz de documentar o padrão de caracteres de desenvolvimento de vertebrados de forma inter e intraespecíficas.

A maioria dos estudos de estadiamento são com espécies criptodiras, e poucos são os estudos com pleurodira, podendo ser destacado o trabalho de Guzman e Bonilla (1990) que descreveu uma série para *Podocnemis unifilis* em condições naturais e artificiais; Hildebrand *et al.*, (1997) e Magalhães *et al.*, (2017) que estudaram *Podocnemis expansa* abordando o desenvolvimento embrionário da espécie em ambiente natural; e Werneburg *et al.*, (2009) que descreveram a embriogênese e a ossificação de *Emydura subglobosa* e padrões os de desenvolvimento para tartarugas, sendo esse último o único a utilizar o Standard Event System para a descrição do desenvolvimento da espécie

Podocnemis unifilis (Troschel, 1848), conhecida popularmente como tracajá, está entre as espécies mais comuns da Amazônia, sendo atualmente a mais procurada e consumida no médio e baixo rio Jaú, cidades de Novo Airão e Manaus, o que levou a sobre-exploração de adultos, juvenis e ovos para consumo e venda nos mercados. (Ferrara *et al.*, 2017), impulsionando a espécie ao status considerado vulnerável pela IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza (2008), catalogada pelo CITES (Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Selvagens Ameaçadas de Extinção) – Apêndice II. O tracajá habita uma variedade de habitats, tais como lagos, grandes rios, lagos de meandro, pântanos, brejos e lagoas (Ferrara *et al.*, 2017). Essa espécie pode desovar em praias de areia, em lama semi-seca e barrancos às margens dos rios, lagos e paranás. Deposita de 11 a 35 ovos em cada desova e o período de incubação dos ovos dura cerca de 45 a 70 dias (Fachín-Terán & Von Mülhen, 2006; Vogt, 2008). Para a espécie, a temperatura de incubação é um fator importante, pois define o sexo dos filhotes, além de aspectos como o peso do filhote, grau de desenvolvimento, sucesso de eclosão e duração do período de incubação (Bull & Vogt, 1981; Souza & Vogt, 1994).

Obter informações sobre a embriologia básica de espécies de quelônios é uma importante contribuição na conservação das espécies, manejo e avaliar efeitos da intervenção humana sobre os ninhos (Kaska & Downie, 1999). No entanto, em um trabalho realizado com *P. unifilis* na Colômbia, sob temperatura de 30°C em ambiente natural (Guzman & Bonilla, 1990) foi descrito o aparecimento das estruturas mas não houve explicação sobre as modificações que estas sofrem durante o desenvolvimento.

A fase da incubação dos ovos é o período mais vulnerável no ciclo de vida dos quelônios, e um bom conhecimento sobre os fatores que influenciam a incubação e a embriogênese pode ser essencial para que a conservação e o manejo destes animais sejam bem-sucedidos (Braga, 2016). Além disso, as informações sobre o desenvolvimento da

espécie pode ser usado para entender parte dos aspectos da biologia evolutiva e na reconstrução de filogenias (Shubin & Alberch, 1986, Mabee *et al.*, 2000; Gilbert *et al.*, 2001). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi descrever o desenvolvimento embrionário de *P. unifilis* sob temperatura controlada.

MATERIAL E MÉTODOS

Processamento e Análise Macroscópica

A partir do quarto dia de incubação foram coletados, diariamente da incubadora, dois ovos a partir do quarto dia de incubação. No entanto, em alguns dias, devido a não presença de embrião em um dos ovos, somente um embrião foi analisado. O embrião foi retirado com auxílio de tesoura cirúrgica e induzidos a morte seguindo o protocolo: embriões até o 17º de incubação através da submersão em Cloridrato de Lidocaína (2%), e posteriormente conforme o crescimento do embrião, volumes entre 0,5 e 2 ml do mesmo anestésico foram administrados por injeção via intraperitoneal (Magalhães *et al.*, 2017). O processamento foi iniciado a partir da certeza de que os embriões já estavam mortos.

A documentação fotográfica macroscópica dos embriões foi realizada no Laboratório Temático de Microscopia Eletrônica e Nanotecnologia – LTMN do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, sendo utilizado estereomicroscópio Zeiss (Stemi SV 11) com câmera AxioCamICc 5 acoplada, além do uso de uma câmera digital Canon SX270 HS. As fotos foram tiradas em aumentos variados buscando melhor riqueza de detalhes para a descrição do desenvolvimento embrionário da espécie. Em menor aumento (0.6x) foram obtidas imagens de uma visão geral do embrião, e para estruturas específicas como olhos, membros e processo mandibular, aumentos maiores foram utilizados (0.8x, 1.0x, 1.2x).

Descrição do Estadiamento

O Standard Event System (SES) desenvolvido por Werneburg (2009), foi utilizado para descrever morfologicamente o desenvolvimento embrionário. A tabela disponibilizada digitalmente *on line* pelo autor (<https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0005887.s002&type=supplementary>) (em anexo) é um sistema padrão para estudos de desenvolvimento embrionário de vertebrados, na qual é possível apresentar o desenvolvimento das principais estruturas embrionárias.

A tabela de Werneburg (2009) é de simples preenchimento e foi utilizada para descrever os embriões individualmente, ou seja, mesmo havendo dois embriões do mesmo dia de incubação, cada embrião foi descrito separadamente, permitindo dessa forma considerar variações do desenvolvimento embrionário existente entre indivíduos de um mesmo dia de incubação. As descrições foram realizadas ao longo de todo o período de incubação, e para realizar as descrições, fez-se uso das imagens macroscópicas realizadas dos embriões.

Para a divisão do desenvolvimento em fases embrionárias, foi levada em consideração a semelhança ou diferença nas estruturas utilizadas como parâmetros, sendo elas: cabeça, processo mandibular, olhos, membros, detalhes da carapaça e do plastrão e da cauda (Magalhães *et al.*, 2017).

RESULTADOS

O período de incubação durou 60 dias, com temperatura média de $31,8 \pm 0,8^{\circ} \text{C}$ ($31,1^{\circ}\text{C} - 32,1^{\circ}\text{C}$) e umidade $97,1 \pm 3,3\%$ ($83\% - 99\%$). Os ovos apresentaram casca rígida e formato elíptico, peso médio de $20,4 \pm 2,7\text{g}$ ($14,4\text{g} - 29,9\text{g}$), comprimento médio $4,2 \pm 0,2 \text{ cm}$ ($3,8\text{cm} - 4,6 \text{ cm}$) e largura média $3,0 \pm 0,2 \text{ cm}$ ($3,8\text{cm} - 2,6 \text{ cm}$).

***P. unifilis* 1 (Figura 1 A)**

De 11 a 15 pares de somitos. Bulbo da cabeça está flexionado ventralmente. A região presuntiva do bulbo cardíaco é visível. Idade: 4 dias

***P. unifilis* 2 (Figura 1 B, C, D, E)**

De 16 a 22 pares de somitos estão presentes. No processo de desenvolvimento da cabeça, uma projeção cefálica é localizada rostralmente e três vesículas cerebrais são identificadas. A fosseta ótica e vesícula óptica são visíveis. Nessa fase tem início o desenvolvimento do processo maxilar e do arco mandibular. As 1^o e 2^o fendas faríngeas são visíveis. A prega neural anterior encontra-se fechada e a posterior aberta. Uma prega lateral na região posterior do corpo indica o local de formação dos membros. Já apresentam bulbo cardíaco e o botão inicial para a formação da cauda. Idade: 5 e 6 dias

***P. unifilis* 3 (Figura 1 F,G)**

Nessa fase o desenvolvimento da vesícula da lente do olho já é visível. Os 3^o e 4^o arcosfaríngeos estão evidentes. As 1^o e 2^o fendas faríngeas são visíveis e a 3^o permanece como um

sulco. No bulbo cardíaco é visível o ventrículo em forma de S. Os brotos dos membros anteriores e posteriores tornam-se visíveis sendo mais largos do que longos e desenvolvem-se de forma simultânea. A cauda alonga-se e curva-se para a região dorsal do corpo. Idade: 7 dias

***P. unifilis* 4 (Figura 1 H)**

A vesícula ótica é visível. A fosseta olfativa é visível, dando início ao processo de formação nasal. O processo maxilar encontra-se no nível da margem posterior do olho. O 3°, 4° e 5° arcos faríngeos estão formados. A 3° fenda faríngea está evidente. O corpo apresenta flexão cervical de 90° formando uma curvatura dorsal. O bulbo cardíaco é claramente visível. Os membros apresentam dimensões (largura x comprimento) equivalentes. A cauda está se tornando mais alongada que nos dias anteriores e curvada para a região dorsal do corpo. Idade: 8 dias

***P. unifilis* 5 (Figura 1 I)**

O sulco nasolacrimal é visível. O processo maxilar se encontra na linha media da lente. Os 3°, 4° e 5° arcos faríngeos estão formados por completo, e as 1°, 2°, 3° e 4° fendas faríngeas bem visíveis, com a 1° começando a se fechar. Os membros começam a se alongar. Idade: 9 dias

***P. unifilis* 6 (Figura 1 J)**

A vesícula ótica está se tornando inconspícua. O contorno da lente apresenta pigmentação preta. Inicia-se a formação da pupila. O processo maxilar encontra-se anterior a lente do olho. O processo mandibular esta posterior ao olho. As fendas faríngeas ainda estão visíveis, porem é perceptível seu fechamento. A porta intestinal anterior está aberta e o alantoide é presente. O membro é mais longo que largo. A cauda se alonga e se mantem curvada dorsalmente. Idade: 10 dias

***P. unifilis* 7 (Figura 1 K)**

A vesícula ótica é inconspícua. Os 3°, 4° e 5° arco faríngeo ainda são visíveis. A 1° fenda faríngea está fechada, mas a 2°, 3° e 4° ainda estão levemente visíveis. O processo mandibular esta posterior ao olho. A porta intestinal está aberta. Os membros estão alongados e mais desenvolvidos que o dia anterior e estão em forma de pá. A cauda apresenta alongamento e curvatura para a região ventral do corpo. Idade: 11 e 12 dias

***P. unifilis* 8 (Figura 1 L)**

O sulco nasolacrimal está mais profundo. Nos olhos a pigmentação preta se torna mais intensa, e é possível ver a presença de fissura coróide. As fendas faríngeas estão fechadas. O processo maxilar se encontra além da altura da região anterior da lente. O processo mandibular encontra-se entre a região posterior do olho e a região posterior da lente. A porta intestinal esta restrita a região central do corpo, e fecha com o passar dos dias de incubação ficando apenas a região por onde se insere a vesícula vitelina. O intestino está herniado. O sulco carapacial e a formação do plastrão na região posterior são levemente visíveis nessa fase do desenvolvimento. Os membros apresentam placa digital. O cotovelo é levemente visível com 13 dias de incubação e torna-se mais visível com 14 dias. Idade: 13 e 14 dias

***P. unifilis* 9 (Figura 2 A)**

É observado o primeiro indício do aparecimento da pálpebra. O processo maxilar se encontra na altura da região anterior do olho. O processo mandibular encontra-se posterior a lente do olho. A crista da carapaça se alonga longitudinalmente formando a borda lateral da carapaça que está claramente visível, porém ainda não é delimitado anteriormente e nem posteriormente. O intestino está visivelmente herniado. O bulbo cardíaco ainda está visível, porém começa a diminuir nos dias seguintes. Os membros possuem placa digital mais desenvolvida que o dia anterior e a crista ectodérmica apical (AER) está presente. Idade: 15 a 17 dias

***P. unifilis* 10 (Figura 2 B, C)**

A pálpebra se torna mais visível. O maxilar está fusionado. O processo mandibular encontra-se na altura da região média da lente. A carapaça esta claramente delimitada na porção anterior e posterior. O bulbo cardíaco desaparece, e a formação do plastrão se torna mais visível com a porção anterior do plastrão delimitada. A ponte que liga a carapaça ao plastrão é levemente visível. Os sulcos digitais são levemente visíveis. A papila urogenital apresenta-se desenvolvida. Idade: 18 e 19 dias

***P. unifilis* 11 (Figura 2 D, E, F)**

A pálpebra começa a crescer sobre os olhos. A narina externa está formada. O processo mandibular encontra-se anterior ao olho. A carapaça possui bordas levemente serrilhadas. A formação das costelas é levemente visível, tornando-se mais evidente com 21 dias de incubação. As regiões anterior e posterior do plastrão estão formadas. Os sulcos digitais estão

mais visíveis que nos dias anteriores deixando as extremidades dos membros levemente serrilhados. O serrilhamento dos membros se torna mais evidente com 21 dias de incubação. Idade: 20 e 21 dias

***P. unifilis* 12 (Figura 2 G, H)**

É visível a formação das papilas esclerais no olho. O processo mandibular encontra-se além da região anterior do olho. A região fronto nasal se torna alongada. Escudos marginais da carapaça são levemente visíveis. A carapaça encontra-se além da cauda. O plastrão está completamente formado e delimitado anteriormente e posteriormente. A formação dos escudos do plastrão é levemente visível, pela presença de sulcos entre um escudo e outro. A ponte de ligação entre carapaça e plastrão já é bem identificada dos dois lados. As costelas estão evidenciadas através da carapaça. Região apical da placa digital se torna mais serrilhada, ficando os dígitos mais evidentes com o passar dos dias. Idade: 22 e 23 dias

***P. unifilis* 13 (Figura 2 I, J)**

A pálpebra encontra-se acima da papila escleral. O ouvido, identificado pela membrana timpânica, é levemente visível. Os escudos marginais da carapaça são todos aparentes. Os escudos no plastrão estão mais visíveis, podendo ser identificado o início da formação dos escudos gular, intergular e anal. O serrilhamento dos membros se intensifica ficando mais visível a formação dos dígitos. O botão da papila urogenital ainda está presente, porém menor. Idade: 24 e 25 dias

***P. unifilis* 14 (Figura 2 K,L)**

As papilas esclerais estão desaparecendo. Ocorre o início de pigmentação branco osso da maxila e da mandíbula. O ouvido é visivelmente observado. A carúncula e a ranfoteca surgem. A carapaça está claramente limitada com placas já definidas (marginais, laterais e centrais), e ocorre leve pigmentação de cor marrom claro nos escudos centrais e anteriores da carapaça. Com a intensificação do serrilhamento da placa digital e diminuição das membranas interdigitais os dígitos são formados. Leve pigmentação dos membros com pontos marrom claro. Idade: 26 a 28 dias

***P. unifilis* 15 (Figura 3 A,B)**

A pálpebra atinge a região das papilas esclerais que estão se tornando inconspícuas. Pigmentação marrom escuro no osso da mandíbula, ao redor do olho e na região da narina. A

pigmentação da carapaça está se tornando mais evidente com coloração cinza. Nesse período as membranas interdigitais regridem e as garras se formam. Idade: 29 dias

***P. unifilis* 16 (Figura 3 C, D)**

A pálpebra encontra-se abaixo da linha da esclera e com 32 dias alcança a lente do olho. Apresenta pigmentação marrom escura na região frontonasal. Aumento da pigmentação marrom na cabeça, estando mais intensa na região frontonasal. A mandíbula inferior está formada e atinge o ponto de oclusão com a maxila. Ocorre um aumento da pigmentação da carapaça em cor cinza mais escuro. Os escudos marginais, laterais e centrais da carapaça estão delimitados de cor marrom escuro. Os membros levemente pigmentados em cor cinza. As membranas interdigitais tornam-se arredondadas e as garras mais alongadas. A 5ª garra é pouco evidente nos membros posteriores. Idade: 30 a 33 dias

***P. unifilis* 17(Figura 3 E, F)**

A pálpebra aumenta deixando apenas a região central do olho exposta. É possível observar pigmentação de cor clara ao redor dos olhos. A região frontonasal esta mais escura, tornando-se quase preta. A pigmentação da carapaça está ficando marrom e uniforme nos escudos marginais, laterais e centrais. A borda dos escudos marginais apresentam cor creme. O plastrão apresenta os escudos intergular, gular e peitoral delimitados de cor marrom escuro. A prega transversal no plastrão é levemente visível, estando localizada nos escudos abdominais. As garras tornam-se enrijecidas apresentando as extremidades em tons claros. Idade: 34 a 36 dias

***P. unifilis* 18(Figura 3 G, H)**

O pescoço apresenta pigmentação mais escura na região dorsal e menos na região ventral. Aos 39 dias já é possível observar os limites das placas ósseas frontal e parietal da cabeça bem definidas. As manchas na cabeça começam a ficar melhor visíveis, pigmentação marrom na região central da placa parietal e na região frontonasal, enquanto ao redor dos olhos está creme. O osso mandibular e maxilar apresenta pigmentação de cor creme. É possível observar um barbelo bem abaixo da região medial do osso mandibular. Nas extremidades laterais da mandíbula é possível identificar duas protuberâncias. A prega transversal no plastrão está mais acentuada. Os membros são de cor cinza claro e tem início o aparecimento de dobras cutâneas nos membros e na cauda. As garras estão em coloração creme. Papila urogenital inconspícua e a cloaca está formada. Idade: 37 a 39 dias

***P. unifilis* 19 (Figura 3 I, J)**

Pigmentação marrom escuro no centro da placa frontal, frontonasal e na lateral das placas parietais, enquanto que nas regiões lateral da placa frontal, região central das placas parietais e ao redor dos olhos apresenta um tom de creme. Os limites das placas ósseas da cabeça apresentam delimitação preta. A carapaça é de cor marrom claro com limites entre os escudos em cor preto. A 5^o garra do membro inferior não é visível e as dobras cutâneas nos membros tornam-se mais visíveis. Idade: 40 a 43 dias

***P. unifilis* 20 (Figura 3 K, L)**

As regiões da cabeça que antes eram marrom escuro se tornam marrom claro, enquanto que as regiões que eram creme estão se tornando amarelo claro, e se intensificam com 44 dias. A carapaça apresenta cor marrom claro. É possível identificar que o tom de marrom da carapaça vai variando ao longo dos dias finais do desenvolvimento. Os escudos do plastrão estão todos bem delimitados, os escudos anteriores com pigmentação creme, o que é posteriormente observado na porção posterior (42 dias), e com 47 dias os limites entre os escudos do plastrão ficam delimitados de preto. A prega transversal no plastrão torna-se mais acentuada. Os membros apresentam cor em cinza mais escuro com as dobras cutâneas mais intensas com 46 dias. As membranas interdigitais são flexíveis e se encontram quase na altura das garras. Idade: 44 a 47 dias

***P. unifilis* 21 (Figura 3 M, N)**

A pigmentação das manchas amarela da cabeça se tornam mais intensa, o que é característico da espécie. Sulco frontonasal marcado com pigmentação marrom e o osso nasal orbital amarelo. Osso mandibular e a extremidade do osso maxilar apresentam pigmentação amarela. As dobras cutâneas nas regiões ventral e dorsal do pescoço são visíveis. A prega transversal no plastrão se tornou mais profunda. As dobras cutâneas estão mais evidentes nos membros e cauda. Idade: 48 a 53 dias

***P. unifilis* 22 (Figura 3 O, P, Q, R)**

Nos últimos dias de incubação as principais diferenças se encontram na pigmentação da carapaça e principalmente nos escudos da cabeça. As manchas amarelas da cabeça se tornam mais intensa, e ao se aproximar do 58^o dia de incubação, a coloração amarela fica com um tom amarelo gema. A extremidade da região nasal é pigmentada de amarelo. A pigmentação marrom da cabeça vai se torna-se mais escura. O pescoço apresenta dobras cutâneas mais evidentes na região ventral e de pigmentação creme. A carapaça apresenta cor em marrom.

Os membros estão com a pele mais enrugada e apresenta cor cinza bem escuro. Idade: 54 a 59 dias

***P. unifilis* 23 (Figura 3 S, T)**

A cabeça apresenta as manchas amarelas bem intensas no centro das placas ósseas parietais, frontonasal, ao redor dos olhos, maxilar e mandibular. O escudo frontal apresenta o centro pigmentado de marrom e as extremidades laterais apresentam duas manchas amarelas. O osso mandibular contém manchas amarelas e extremidades escuras. A pele na parte ventral do pescoço é amarelada e enrugada. A carapaça é marrom escuro com os escudos delimitados de preto e os escudos marginais com bordas em tom de amarelo claro. A prega transversal do plastrão está bem reduzida. Os escudos do plastrão são de cor cinza e amarelo claro e delimitados de preto. A hérnia umbilical está presente e contém parte do saco vitelino. Os membros são de cor cinza escuro e as dobras cutâneas estão em evidência. As extremidades das membranas interdigitais e as garras apresentam pigmentação creme. Nos membros superiores observa-se que a extremidade apresenta um tom mais claro. Idade: 60 dias (recém eclodido)

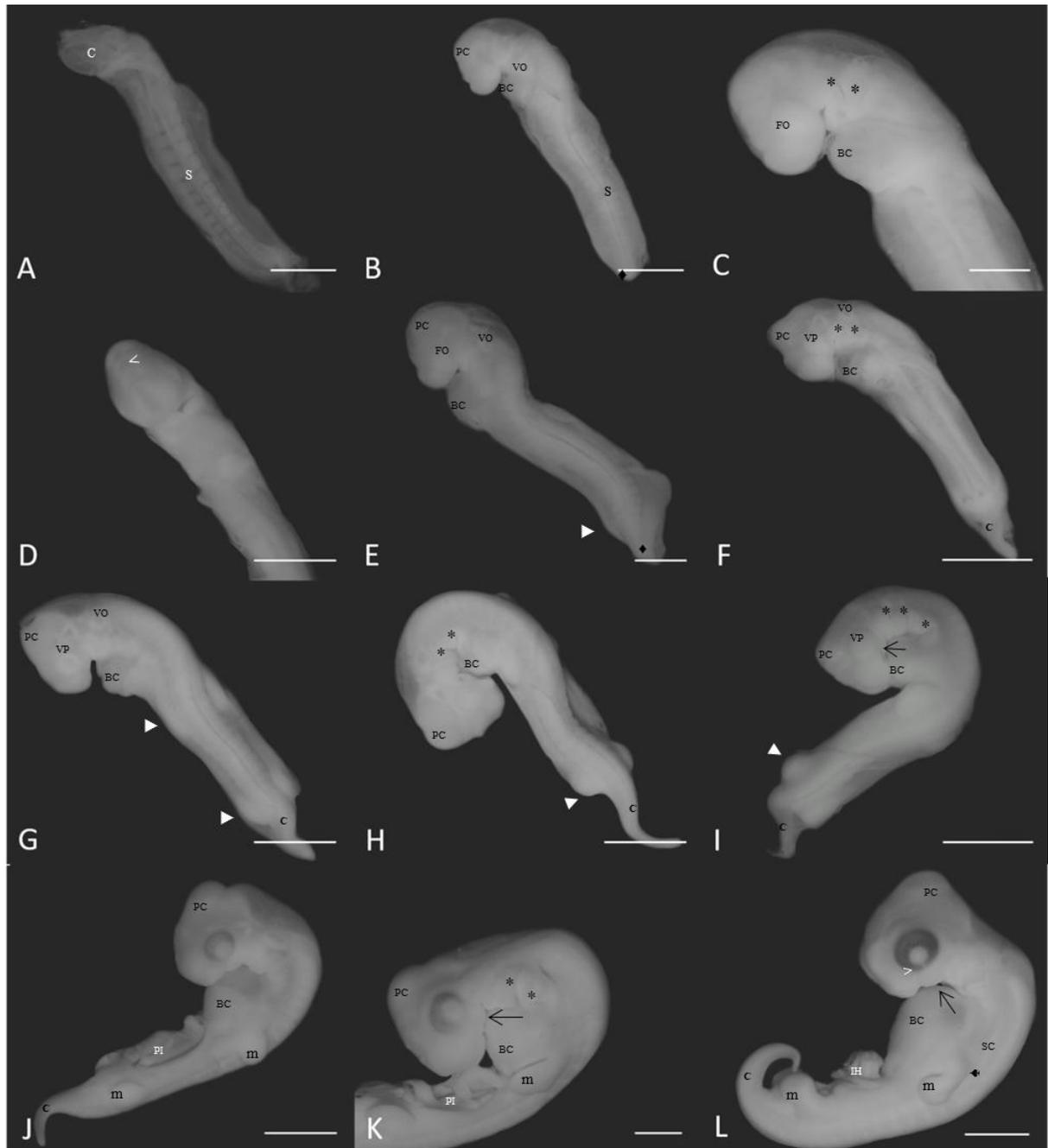


Figura 1: embriões de *P. unifilis* em diferentes dias de incubação. **A)** 4 dias, vista ventral; **B)** 5 dias, vista dorsal; **C)** 5 dias, vista lateral; **D)** 5 dias, vista ventral; **E)** 6 dias, vista lateral; **F)** 7 dias, vista lateral; **G)** 7 dias, vista dorsal; **H)** 8 dias, vista dorsal. **I)** 9 dias, vista dorsal; **J)** 10 dias, vista lateral; **K)** 11 dias, vista lateral; **L)** 14 dias, vista lateral. *C* bulbo da cabeça, *S* somitos, * fendas faríngeas, *Pc* projeção cefálica, *Vo* vesícula ótica, *Vp* vesícula ótica, *Bc* bulbo cardíaco, *Fo* fosseta ótica, < vesículas cerebrais, \blacklozenge botão da cauda, \blacktriangleright formação dos membros, *C* cauda, *PI* porta intestinal, *seta* processo mandibular, > fissura coroide, *Ih* intestino herniado, *m* membros, *Sc* sulco carapacial, \spadesuit cotovelo. Barra de escala = Imagem C - 600µm, imagens A,B,C,D,E,K - 1000µm, imagens F,G,H,I,J - 2000µm.

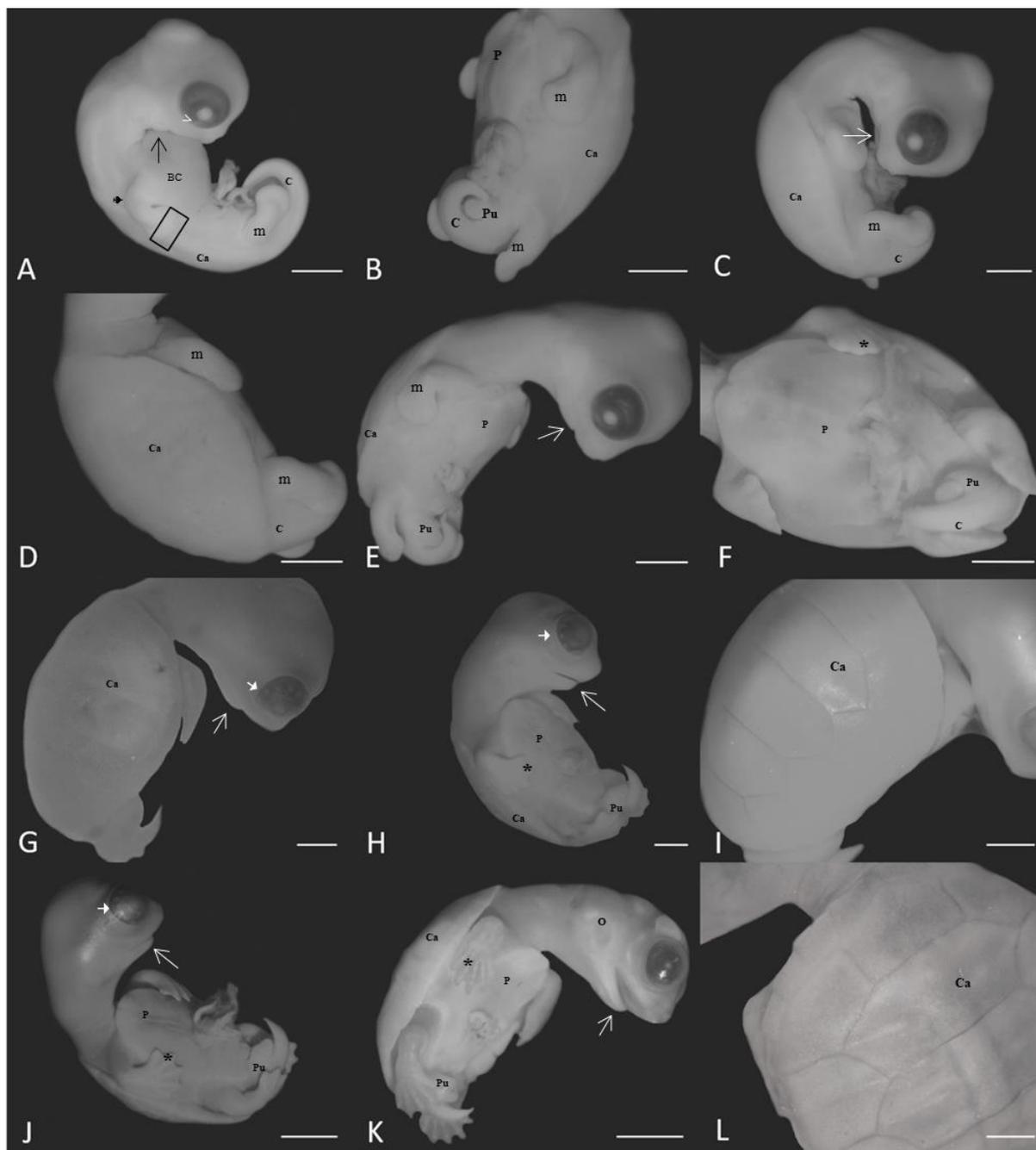


Figura 2: embriões de *P. unifilis* em diferentes dias de incubação. **A)** 16 dias, vista lateral; **B)** 19 dias, vista lateral; **C)** 19 dias, vista lateral; **D)** 20 dias, vista dorsal; **E)** 20 dias, vista lateral; **F)** 21 dias, vista ventral; **G)** 23 dias, vista dorsal; **H)** 23 dias, vista ventral; **I)** 24 dias, vista dorsal; **J)** 24 dias, vista ventral; **K)** 26 dias, vista ventral; **L)** 26 dias, vista dorsal. *Bc* bulbo cardíaco, *C* cauda, *seta* processo mandibular, *>* fissura coroide, *→* papilas esclerais, *m* membros, *Pu* papila urogenital, *Ca* carapaça, *P* plastrão, * serrilhamento dos membros, ♣ cotovelo, *retângulo* crista ectodérmica apical (AER), *O* membrana timpânica. Barra de escala = Imagens A,B,C,D,E,F,G,H,I 2000µm, imagens J,K - 4000µm.

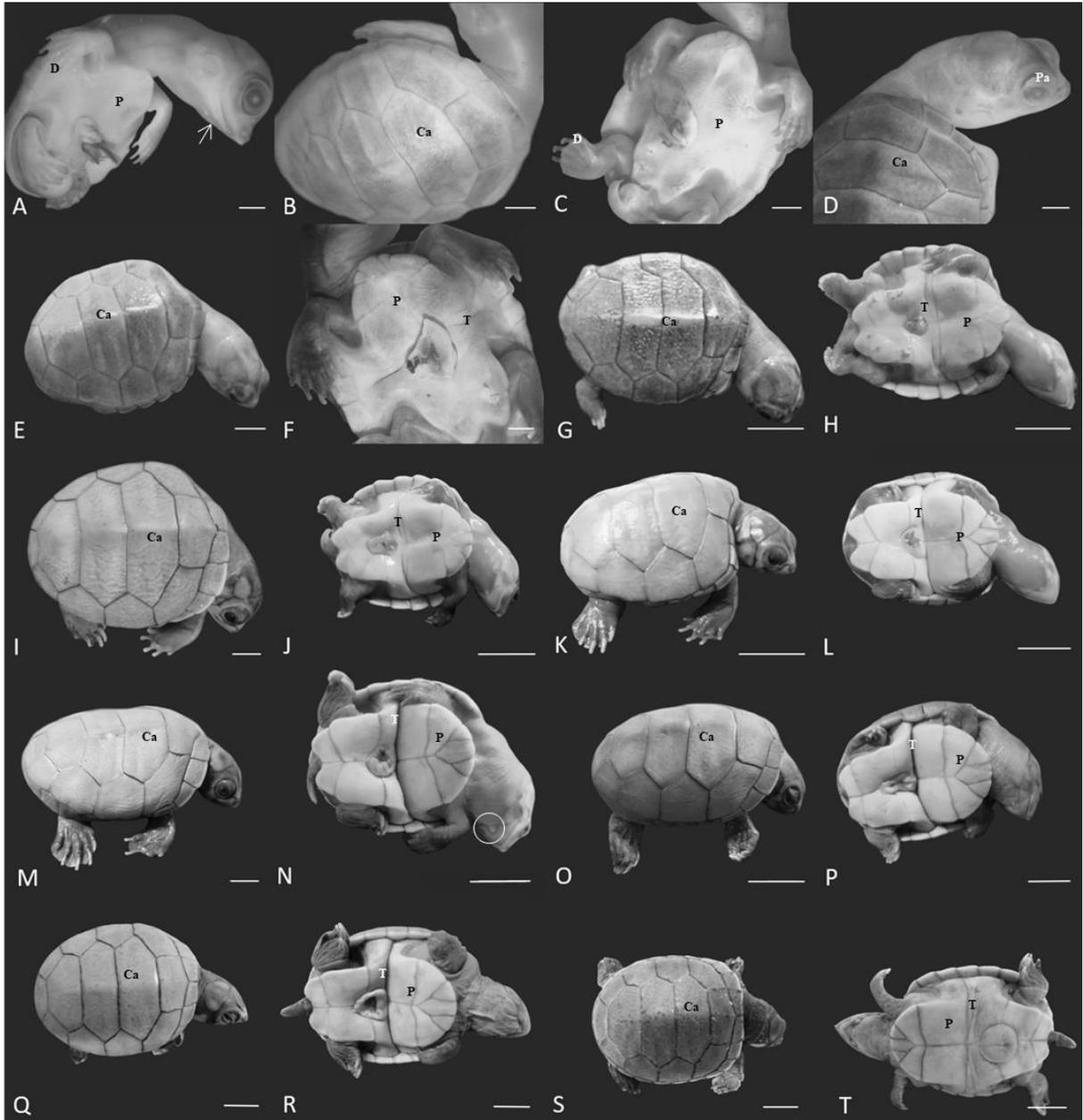


Figura 3: embriões de *P. unifilis* em diferentes dias de incubação. **A)** 29 dias, vista ventral; **B)** 29 dias, vista dorsal; **C)** 30 dias, vista ventral; **D)** 33 dias, vista dorsal; **E)** 36 dias, vista dorsal; **F)** 34 dias, vista ventral; **G)** 38 dias, vista dorsal; **H)** 29 dias, vista ventral; **I)** 43 dias, vista dorsal; **J)** 40 dias, vista ventral; **K)** 46 dias, vista dorsal; **L)** 47 dias, vista ventral; **M)** 52 dias, vista dorsal; **N)** 50 dias, vista ventral; **O)** 55 dias, vista dorsal; **P)** 55 dias, vista ventral; **Q)** 58 dias, vista dorsal; **R)** 58 dias, vista ventral; **S)** 60 dias, vista dorsal; **T)** 60 dias, vista ventral. *seta* processo mandibular, *Ca* carapaça, *P* plastrão, *D* dígitos, *circulo* barbelo, *T* prega transversal. Barra de escala = imagens A,B,C,D,F - 2000 µm, imagens I,M - 0,5 cm, imagens E,G,H,J,K,L,N,O,P,Q,R,S - 1cm.

DISCUSSÃO

A identificação das estruturas e divisão dos dias de incubação em estádios de desenvolvimento utilizando o SES é diferente se comparado às demais tabelas de desenvolvimento habitualmente utilizada em outros estudos (Yntema, 1968; Packard *et al.*, 1977; Crastz, 1982; Miller, 1985; Guzman & Bonilla, 1990; Beggs *et al.*, 2000; Tokita & Kuratani, 2001; Greenbaum, 2002; Greenbaum & Carr, 2002; Okada *et al.*, 2011; Cordero & Janzen, 2014; Braga, 2016; Magalhães *et al.*, 2017), pois esse sistema possibilita a descrição das principais características morfológicas de forma individual, tornando as variações intraespecífica e interespecífica mais fáceis de serem identificadas.

Nosso estudo é o primeiro a descrever o desenvolvimento embrionário de uma espécie da família Podocnemididae, *Podocnemis unifilis*, utilizando o Standard Event System (Werneburg, 2009). Nossa descrição compreende o desenvolvimento da espécie desde o 4º dia de incubação até o momento de eclosão em incubação artificial com temperatura média controlada de 31,8°C, expondo todas as características e variações observadas entre os dias de incubação. Outro estudo desenvolvido com *Podocnemis unifilis* foi realizado por Guzman e Bonilla (1990) na Colômbia, no entanto, os autores descreveram o desenvolvimento embrionário de forma resumida, apresentado apenas o momento de aparecimento das estruturas e sem detalhar o desenvolvimento, e com menos caracteres se comparado ao presente estudo.

Existem variações entre as taxas de crescimento dos embriões de vertebrados dentro e entre as espécies, e isso depende da temperatura de incubação (Reiss, 1989). Ackerman & Prange (1972) afirmaram que a umidade e a temperatura atuam diretamente nas trocas gasosas no ambiente de incubação, influenciando o desenvolvimento embrionário e a velocidade do metabolismo desses embriões, com reflexos no sucesso da eclosão e na duração da incubação dos ovos de quelônios.

Em baixas temperaturas o período de incubação aumenta e a taxa de desenvolvimento diminui, enquanto que temperaturas altas diminuem a duração da incubação e aumentam a taxa de desenvolvimento do embrião (Bull e Vogt, 1981; Alho *et al.*, 1985; Souza e Vogt, 1994; Valenzuela, 2001). Yntema (1976, 1979) mostrou que para *Chelydra serpentina* há uma relação inversa entre a temperatura e a duração da incubação, e uma diminuição de 2 °C na temperatura média aumenta em até 20 dias a duração da incubação. Os ovos incubados em diferentes temperaturas, portanto, apresentam resultados diferentes, com isso as temperaturas

de incubação que esses ovos serão incubados precisam ser levadas em consideração ao fazer essas comparações entre o desenvolvimento (Magalhães *et al.*, 2017).

Estudos evidenciam que os embriões de vertebrados apresentavam significativa variação entre seus estádios, como número de somitos, número de arcos faríngeos, mudanças no padrão de crescimento (alometria) e mudanças no tempo de desenvolvimento (heterocronia) (Richardson, 1995; Richardson *et al.*, 1997; Smith, 1997; Lilja & Blom, 1999; Richardson, 1999; Lilja *et al.*, 2001; Smith, 2001; Smith, 2002). Para esse estudo foram escolhidas características morfológicas que são de fácil identificação e comparação entre espécies de tartarugas, sendo elas, olhos, processo mandibular, carapaça e plastrão, membros e cauda (Magalhães *et al.*, 2017).

Inicialmente foi possível identificar a formação dos olhos no estágio 2 (5 dias) com a presença da vesícula óptica, sendo esse aparecimento mais tardio do que descrito para *P. expansa*, onde a mesma estrutura foi observada com 3 dias de incubação (Magalhães *et al.*, 2017), para *Podocnemis unifilis*, fase 3 (3 dias) (Guzman & Bonilla, 1990) e para *Pelodiscus sinensis* estágio 8 (4 dias) (Tokita e Kuratani 2001). Quando comparado com outras espécies o aparecimento foi mais rápido, *Chelydra serpentina* estágio 7 (9 dias) (Yntema 1968), *Mauremys japonica* estágio 7 (Okada *et al.* 2011), *Chrysemys picta* estágio 6 (Cordero & Janzen 2013) *Kinosternon scorpioides* estágio 9 (Braga, 2016). A vesícula óptica indica o início da formação do olho, e é formada quando indentações bilaterais se desenvolvem para progressivamente constituírem as vesículas (LI *et al.*, 1997; WILSON; HOUART, 2004).

A formação da lente do olho teve início no estágio 3 (7 dias), diferindo das demais espécies que apresentaram a mesma estrutura no estágio 9 (8 e 9 dias), *P. expansa* (Magalhães *et al.*, 2017), *Chelydra serpentina* (Yntema 1968), *Pelodiscus sinensis* (Tokita e Kuratani 2001), *Mauremys japonica* (Okada *et al.*, 2011), *Chrysemys picta* (Cordero e Janzen 2013), exceto para *Podocnemis unifilis* (Guzman & Bonilla, 1990) e *K. scorpioides* (Braga, 2016), onde a formação desta estrutura não foi descrita. O início da formação das papilas esclerais, identificado em nosso estudo no estágio 13 (22 dias) e foi descrito para *P. expansa* aos 13 – 14 dias (estádio 12) (Magalhães *et al.*, 2017).

As papilas esclerais induzem a formação dos ossículos da esclera (Hall 1981; Pinto & Hall 1991). A esclera é uma estrutura resistente que preserva a forma do globo ocular, impedindo que pressões internas e/ou externas modifiquem sua forma (Vieira, 2008). Em alguns estudos dessa estrutura só foi descrita quando a mesma já estava completamente

formada como para *E. subglobosa* (Werneburg *et al.*, 2009) ou não foram descritas como para *P. unifilis* (Guzman & Bonilla, 1990) e *K. scorpioides* (Braga, 2016). É importante destacar que as variações entre espécies no tempo de formação das estruturas está ligado as condições nas quais as espécies foram incubadas.

O desenvolvimento do processo maxilar, observado inicialmente no estágio 4 (8 dias) localizado no nível da margem posterior do olho, é identificado antes do início da formação do mandibular que foi inicialmente observado somente do estágio 7 (11 dias). Ambos são formados a partir do 1º arco faríngeo. Em *P. expansa* o processo mandibular começa aproximadamente no estágio 11 (11- 12 dias) (Magalhães *et al.*, 2017), no nível posterior do olho. O mesmo foi observado para *Chrysemys picta* (Cordero & Janzen 2013) e *C. serpentina* (Yntema 1968) no estágio 13, *M. japonica* (Okada *et al.*, 2011) no estágio 14 e em *K. scorpioides* o processo mandibular foi registrado no estágio 11 e se encontrava na direção do olho (Braga, 2016). Neste estudo o maxilar é visto completamente fusionado no estágio 10 (18 dias) e a formação final da mandíbula ocorre no estágio 16 (30 dias) quando atinge o ponto de oclusão com a maxila, que também foi descrito para *P. expansa* estágio 19 (33 a 35 dias) (Magalhães *et al.*, 2017), e *Chrysemys picta* (estágio 21) (Cordero & Janzen 2013). Espécies pleurodira e cryptodira apresentam um tempo diferente de desenvolvimento do processo mandibular Werneburg *et al.*, (2009).

A carapaça teve início a partir do aparecimento de um sulco carapacial na região lateral do corpo do embrião e que foi visível inicialmente no estágio 8 (13 dias) que posteriormente alongou-se no sentido longitudinal e formou a borda da carapaça no estágio 9 (15 dias). A crista ou sulco carapacial (*carapacial ridge*) é o primeiro indício da carapaça durante a fase embrionária (Nagashim *et al.*, 2012) e desenvolve-se inicialmente localizada na região lateral entre os membros, estendendo-se posteriormente entre a porção cranial e caudal. Para outras espécies o aparecimento desta estrutura foi descrito mais tardiamente, para *P. expansa* estágio 13 (12 dias) (Magalhães *et al.*, 2017) e *M. japonica* estágio 13 (Okada *et al.*, 2011), na qual a crista carapacial é visível, e para *Chrysemys picta* (Cordero & Janzen, 2013) e *C. serpentina* (Yntema, 1968) no estágio 14.

A crista carapacial parece ser a estrutura morfológica que induz o crescimento horizontal das costelas (Burke, 1989), de maneira similar a crista ectodérmica apical (*apical ectodermal ridge*) tem um papel de indução no crescimento distal do broto do membro (Saunders, 1948; Gilbert, 2010). Assim, a formação da crista carapacial é ao menos um dos

eventos ontogenéticos por trás do desenvolvimento da carapaça das tartarugas, sendo fundamental para o padrão de crescimento das costelas (Burke, 1991; Nagashima *et al.*, 2007).

Com o desenvolvimento dos escudos e posterior pigmentação na carapaça é possível perceber variações nos padrões de pigmentação entre embriões de dias diferentes de incubação e/ou do mesmo dia de incubação. Werneburg (2009) destaca que a carapaça da tartaruga apresenta variações nos estágios de desenvolvimento e na morfologia e coloração.

O desenvolvimento inicial do plastrão ocorreu após o início da formação da carapaça, primeiramente na região posterior e em seguida na anterior da região ventral do embrião, dessa forma promovendo o desaparecimento do bulbo cardíaco. Sendo visto inicialmente no estágio 10 (18 dias) apresentando a porção anterior em formação, e no estágio 11 (20 dias) as regiões anterior e posterior do plastrão estavam delimitadas. A formação do plastrão para outras espécies ocorreu em fases diferentes do desenvolvimento, em *P. expansa* estágio 15 (Magalhães *et al.*, 2017), *Pelodiscus sinensis* estágio 16 (Tokita & Kuratani 2001) e *Chrysemys picta* estágio 16 (Cordero & Janzen 2013), *M. japonica* estágio 17 (Okada *et al.*, 2011). A prega transversal no plastrão observada inicialmente com 34 dias em *P. unifilis*, também foi descrito por Miller (1985) e por Magalhães *et al.*, (2017).

O desenvolvimento dos membros apresentou uma sequência de estruturas identificadas como membro em forma de pá, placas digitais, crista ectodérmica apical (AER), sulcos digitais, dígitos e garras. A AER tem um papel de indução no crescimento distal do broto do membro (Saunders, 1948; Gilbert, 2010). Em *P. unifilis* (Guzman & Bonilla, 1990) o desenvolvimento dos membros foi descrito na fase 13 (15 – 16 dias), porém não foi detalhado se ocorreu essa sequência no desenvolvimento como foi identificado em nosso estudo e, descrito também para *P. expansa* (Magalhães *et al.*, 2017). Em nosso estudo, os membros desenvolveram-se de forma simultânea, assim como observado para *P. expansa* (Magalhães *et al.*, 2017) e *Chrysemys picta* (Cordero & Janzen 2013), porém Tokita & Kuratani (2001) destacam que é tendencioso que os membros se desenvolvam em tempos diferentes, sendo o desenvolvimento dos anteriores ocorrendo antes dos membros posteriores. Fato que foi observado para *C. serpentina* (Yntema, 1968), *Pelodiscus sinensis* (Tokita & Kuratani 2001), *E. subglobosa* (Werneburg *et al.*, 2009) e *M. japonica* (Okada *et al.*, 2011).

O desenvolvimento embrionário de *P. unifilis* incubado artificialmente a uma temperatura média de 31.8° C, no geral é semelhante ao descrito para *P. expansa* incubado em ambiente natural em temperatura média de 30,3°C, considerando as estruturas avaliadas. Porém é de notar que o desenvolvimento de tais estruturas foi mais rápido em *P. unifilis*, estando tal fato associado a temperatura de incubação em que os dois estudos foram realizados. Se comparado ao outro estudo realizado com *P. unifilis* (Guzman & Bonilla 1990), que usou a temperatura de 30°C, o desenvolvimento embrionário da espécie foi mais acelerado no nosso estudo.

Conhecer o período que os caracteres morfológicos externos se formam durante o desenvolvimento embrionário da espécie nos fornece informações importantes quanto ao melhor momento para atividades de transplantes de ninhos em ambiente natural, contribuindo assim para o desenvolvimento e/ou aperfeiçoamento de estratégias de conservação e manejo da espécie. Informações acerca de desenvolvimento embrionário são ainda fundamentais para a compreensão dos mecanismos evolutivos responsáveis por novos fenótipos (Riesch *et al.*, 2011). Estádios embrionários podem ser alvos chave para mudanças macro evolutivas (Richardson *et al.*, 1997) e embriões podem ser considerados fontes de homologies verdadeiras, dando suporte para estudos evolutivos com reptilianos e amniotas (Boughner *et al.*, 2007). Dados de tabelas de desenvolvimento são, portanto, importantes para estudos de origem e evolução de mudanças morfológicas nos grandes grupos filogenéticos (Wisee *et al.*, 2009).

CONCLUSÃO

Neste estudo dados importantes foram gerados para ampliar e/ou melhorar o conhecimento sobre as espécies de quelônios amazônicos e dessa forma contribuir para estratégias de manejo e conservação. Informações embrionárias das espécies amazônicas ainda são escassas, portanto nosso estudo contribui com informações base para pesquisas futuras de desenvolvimento embrionário de outras espécies de tartarugas, e dados importantes que podem ser usados para futuras análises filogenéticas. Porém, é necessário ainda ampliar os estudos com a espécie para entender as variações intraespecíficas, e a relação das temperaturas de incubação com o desenvolvimento das estruturas durante o desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, R. A.; PRANGE, H. D. Oxygen diffusion across a sea turtle (*Chelonia mydas*) egg shell. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.*, 43A: 905-909. 1972.
- AGASSIZ L. (1857) Contributions to the natural history of the United States of America. Embryology of the turtle. Vol II, Part III. Little, Brown and Company, Boston.
- ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. (1994) Molecular biology of the cell, 3rd edn. Garland, New York, p 33.
- BEGGS K, YOUNG J, GEORGES A, WEST P (2000) Ageing the eggs and embryos of the pig-nosed turtle, *Carettochelys insculpta* (Chelonia: Carettochelydidae), from northern Australia. *Can J Zool* 78:373–392.
- BOUGHNER, J.C. *et al.*, (2007) Embryonic development in *Python sebae* – I: Staging criteria and macroscopic skeletal morphogenesis of the head and limbs. *Zoology*, 110: 212-230
- BULL JJ, VOGT RC. (1981) Temperature-sensitive periods of sex determination in Emydid turtles. *J Exp Zool*, 218:435-440.
- BUTLER H, JUURLINK, B.H.J. (1987) An atlas for staging mammalian and chick embryos. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- BURKE AC. (1989) Development of the turtle carapace: implications for the evolution of a novel bauplan. *Journal of Morphology* 199:363-378.
- BURKE AC. (1991) The development and evolution of the turtle body plan. Inferring intrinsic aspects of the evolutionary process from experimental embryology. *American Zoologist* 31:616-627.
- BRAGA B. E. S. (2016) Desenvolvimento embrionário de *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) (Chelonia: Kinosternidae): ontogênese das gônadas masculina e feminina. Universidade Federal do Pará.
- COLLINS, P. (1995) Embryology and development. In: Collins P (ed) *Gray's anatomy*, 38th edn. Churchill Livingstone, London, pp 91–341.

- CORDERO, G. A.; JANZEN, F. J. (2014) An Enhanced Developmental Staging Table for the Painted Turtle, *Chrysemys picta* (Testudines: Emydidae). JOURNAL OF MORPHOLOGY 275:442–455.
- CRASTZ, F. (1982) Embryological stages of the marine turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz). *Revista de Biología Tropical*, 30:113–120.
- DUBOULE, D. (1994) Temporal colinearity and the phylotypic period: a basis for the stability of a vertebrate bauplan and the evolution of morphogenesis through heterochrony. *Development (Suppl.)*, 135–142.
- FACHÍN-TERÁN, A.; VON MÜLHEN, E. M. (2006) Período de desova e sucesso reprodutivo do tracajá *Podocnemis unifilis* TROSCHEL 1848 (Testudines: Podocnemididae) na várzea da RDSM médio Solimões, BRASIL. UAKARI.
- FERRARA, C. R.; FAGUNDES, C. K.; MORCATTY, T. Q.; VOGT, R. C. (2017) Quelônios Amazônicos: Guia de identificação e distribuição. Manaus, WCS.
- GILBERT SF. (2010) *Developmental Biology*. 9a edicao. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- GUZMAN, N. A. B.; BONILLA, H. (1990) O Serie normal del desarrollo morfológico embrionario de *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) (Testudinata, Pelomedusidae). *Acta Biologica Colombiana*. Vol. 2, N°.6:129-150.
- GREENBAUM E. (2002) A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemysscripta*. *Can J Zool*, 80:1350-1370.
- GREENBAUM E, CARR JL. (2002) Staging criteria for embryos of the spiny softshell turtle, *Apalonespinifera* (Testudines: Trionychidae). *J Morphol*, 254:272-291.
- HILDEBRAND, P. V.; BERMUDEZ, N.; PEÑUELA, M. C. (1997) La Tortuga Charapa (*Podocnemis expansa*) em el bajo rio Caquetamazonas, Colombia: Aspectos de la Biología reproductiva y Tecnicas para sua manejo. Colombia: Disloque Editora. 1^a ed.
- KASKA Y, DOWNIE R. (1999) Embryological development of sea turtles (*Cheloniamydas*, *Caretta caretta*) in the Mediterranean. *Zool Middle East*, 19(1):55-69.

- LILJA, C., BLOM, J. (1999) Comparative studies of early embryonic development in Quail *Coturnix coturnix japonica* with different patterns of postnatal growth. *Acta Ornith.* 34, 159–164.
- LILJA, C., BLOM, J., MARKS, H.L. (2001) A comparative study of embryonic development of Japanese quail selected for different patterns of postnatal growth. *Zoology* 104, 115–122.
- MAGALHÃES, M. S. *et al.*, (2017). Embryonic development of the Giant South American RiverTurtle, *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae). *Zoomorphology* 136:523–537
- MAGALHÃES, M. S. (2017) Desenvolvimento embrionário de *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae): descrição do pronefro e mesonefro e diferenciação gonadal em ambiente natural, Balbina, Amazonas. Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus.
- MILLER JD. 1985. Embryology of turtles. In: Gans C, Billett F, Maderson PFA. (Eds.) *Biology of the Reptilia*, vol. 14. New York: John Wiley & Sons. p. 270-317.
- NAGASHIMA H, *et al.*, (2007) On the carapacial ridge in turtle embryos: its developmental origin, function and the chelonian body plan. *Development* 134:2219-2226.
- NAGASHIMA H, *et al.* (2012) Body plan of turtles: an anatomical, developmental and evolutionary perspective. *Anatomical Science International* 87:1-13.
- OKADA Y, YABE T, ODA SI. (2011). Embryonic development of the Japanese Pond Turtle, *Mauremys japonica* (Testudines: Geoemydidae). *CurrHerpetol*, 30:89-102.
- PACKARD, G. C.; TRAEY, G. R.; ROTH, J. (1977) The physiological ecology of reptilian eggs and embryos, and the evolution of viviparity within the class Reptilia. *Biol.Rev.*52: 71- 105.
- PARKER, W. K. (1880) On the structure and development of the skull in the Lacertilia. *Philos. Trans. Roy. Soc.*,170: 595-640
- RATHKE H (1848) Ueber die Entwicklung der Schildkroten. *FreidrichVieweg und Sohn, Braunschweig*.
- REISS JO (1989) The meaning of developmental time: a metric for comparative Embryology. *Am Nat* 134:170–189
- RICHARDSON, MK. (1995) Heterochrony and the Phylotypic Period. *Developmental Biology* 172: 412–421.

- RICHARDSON, M.K.; Hanken, J.; Gooneratne, M.L.; Pieau, C. & Raynaud, A. (1997) There is no highly conserved embryonic stage in the vertebrates: implications for current theories of evolution and development. *Anatomy & Embryology* 196: 91–106.
- RICHARDSON, M. K. (1999) Vertebrate evolution: The developmental origins of adult variation. *Bioessays*, 21: 604–613.
- RIESCH, R., Schlupp, I., Langerhans, R. B., Plath, M. (2011) Shared and unique patterns of embryo development in extremophile poeciliids. *PLoS One*, 6(11), e27377.
- RICKLEFS, R.E., STARCK, J.M. (1998) Embryonic growth and development. In: Starck, J.M., Ricklefs, R.E. (Eds.), *Avian Growth and Development. Evolution Within the Altricial–Precocial Spectrum*. Oxford University Press, Oxford, pp. 31–58.
- SAUNDERS JW JR. (1948) The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *Journal of Experimental Zoology* 108:363-403.
- SOUZA, R. R.; VOGT, R. C. (1994) Incubation temperature influences sex and hatchling size in the Neotropical turtle *Podocnemis unifilis*. *Journal of Herpetology*, 28(4):453-464.
- SHUBIN, NH. & ALBERCH, P. (1986) A morphogenetic approach to the origin and basic organization of the tetrapod limb. *Evolutionary Biology*, 20: 318-390.
- SLACK, J.M.W., HOLLAND, P., GRAHAM, C.F. (1993) The zootype and the phylotypic stage. *Nature* 361, 490–492.
- SMITH, KK. (1997) Comparative patterns of craniofacial development in eutherian and metatherian mammals. *Evolution* 51: 1663–1678.
- SMITH, K.K. (2001) Heterochrony revisited: the evolution of developmental sequences. *Biological Journal of the Linnean Society* 73, 169–186.
- SMITH, K.K. (2002) Sequence heterochrony and the evolution of development. *Journal of Morphology* 252, 82–97
- TOKITA, M.; KURATANI, S. (2001) Normal embryonic stages of the Chinese softshelled turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae). *ZOOLOGICAL SCIENCE* 18(5): 705-715.
- VALENZUELA N. (2001) Constant, Shift, and Natural Temperature Effects on Sex Determination in *Podocnemis expansa* turtles. *Ecology*, 82(11):3010-3024.
- VOGT, R. C. (2008) *Tartarugas da Amazônia*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, AMAZON Conservation Association.

- VIEIRA, L. G. (2008) Ontogenia dos ossos do esqueleto da tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa* Schweigger, 1812 (Testudines: Podocnemididae). Dissertação de mestrado – Universidade federal de Uberlândia.
- YNTEMA CL. (1968) A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. *J Morphol*, 125:219-251.
- YNTEMA CL. (1976) Effects of incubation temperatures on sexual differentiation in the turtle, *Chelydra serpentina*. *J Morphol*, 150:453-461.
- YNTEMA CL. (1979) Temperature levels and periods of sex determination during incubation of eggs of *Chelydra serpentina*. *Journal of Morphology*, 159(1):17-27.
- WERNEBURG I. (2009) A standard system to study vertebrate embryos. *PLoS ONE* 4, e5887. Doi: 10.1371/journal.pone.0005887.
- WERNEBURG I, HUGI J, MULLER J, SÁNCHEZ-VILLAGRA MR (2009) Embryogenesis and ossification of *Emydura subglobosa* (Testudines, Pleurodira, Chelidae) and patterns of turtle development. *DevDynam* 238:2770–2786
- WISE, P.A.D.; VICKARYOUS, M.K., RUSSEL, A.P. (2009) An embryonic staging table for in ovo development of *Eublepharis macularius*, the leopard gecko. *The Anatomical Record*, 292: 1198-1212.
- WOLPERT L. (1991) *The triumph of the embryo*. Oxford University Press, Oxford.

Capítulo II

Desenvolvimento e diferenciação gonadal durante o desenvolvimento embrionário de
Podocnemis unifilis (Testudines: Podocnemididae) em temperatura controlada

Título

Desenvolvimento e diferenciação gonadal durante o desenvolvimento embrionário de *Podocnemis unifilis* (Testudines: Podocnemididae) em temperatura controlada

AUTORES

Maria Fabiele S. Oliveira¹, Richard C. Vogt², Lucas Castanhola Dias³ Marcela S. Magalhães⁴

¹Mestranda em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil.

²Centro de Estudos dos Quelônios da Amazônia, Coordenação de Biodiversidade, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil.

³Laboratório Temático de Microscopia Eletrônica e Nanotecnologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil.

⁴Departamento de Morfologia, Laboratório de Histologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

RESUMO

A temperatura é o elemento principal da determinação sexual de inúmeras espécies de tartarugas. Esse estudo objetivou caracterizar o desenvolvimento e a diferenciação das gônadas em *Podocnemis unifilis* em temperatura controlada. Foram realizadas análises macroscópicas, microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. O desenvolvimento gonadal foi agrupado em três etapas: células germinativas primordiais, estabelecimento da gônada indiferenciada e diferenciação gonadal. As células germinativas primordiais (CGPs) só foram visualizadas a partir do 7º dia de incubação, e encontravam na região posterior do corpo do embrião e entre os dias 9 e 11 de incubação foi possível observar a migração das CGPs a partir do saco vitelínico em direção a região ventromedial do mesonefro. Aos 20 dias de desenvolvimento a gônada indiferenciada estava estabelecida sendo identificadas duas regiões distintas, a região cortical externa caracterizada pela presença de CGPs, e a região medular interna onde os cordões sexuais primitivos foram presentes. A diferenciação gonadal teve início após 35 dias de incubação com o início da organização dos cordões sexuais para a formação dos túbulos seminíferos. As etapas de diferenciação gonadal foram semelhantes a de outras espécies de quelônios com determinação do sexo pela temperatura (TSD), no entanto mais estudos precisam ser realizados com diferentes temperaturas tendo em vista que em nosso estudo todos os indivíduos analisados foram machos. Não se tem uma explicação concluída para o fato de somente indivíduos machos terem sido encontrados no presente estudo, portanto mais estudos precisam ser realizados com diferentes temperaturas para compreender os mecanismos de determinação do sexo em *Podocnemis unifilis*.

Palavras-chave: Determinação sexual, temperatura, quelônios.

INTRODUÇÃO

Atualmente é de consenso que a temperatura é o elemento principal da determinação sexual de inúmeras espécies de tartarugas (Ferreira Júnior, 2009). A determinação sexual de quelônios dependente da temperatura (TSD), também pode ser influenciada por fatores como: localização, composição, tamanho e granulometria do sedimento do ninho, condições climáticas, local de desova, profundidade do ninho e a vegetação local (Bull & Vogt, 1981; Mrosovsky & Provancha, 1989; Ackerman, 1997; Naro-Maciel *et al.*, 1999; Ferreira Júnior, 2003; Miller *et al.*, 2004).

Três tipos de padrões para determinação sexual dependente da temperatura em répteis são descritos por Ewert & Nelson (1991), sendo eles TSDI: onde fêmeas são geradas em maior quantidade em temperaturas altas e machos em temperaturas baixas; TSDII: temperaturas altas geram mais filhotes machos e temperaturas baixas, mais fêmeas; TSDIII: maior ocorrência de fêmeas em temperaturas altas e baixas, e machos em temperaturas intermediárias. Existe uma temperatura na qual ocorrerá a mesma chance de formação de ambos os sexos em proporções iguais (50% de machos e 50% de fêmeas ou razão sexual de 1:1), sendo essa temperatura denominada de pivotal ou central (Yntema & Mrosovsky, 1982).

Existe um período durante a incubação dos ovos no qual o embrião é sensível à temperatura do ambiente, e é nesse intervalo de tempo denominado de período termossensível (TSP) que a diferenciação do sexo do indivíduo é definido. Somente durante o período termossensível, que ocorre entre 18 a 30% do desenvolvimento embrionário (Pieau, 1996; Rhen *et al.*, 2015), é que ocorre a diferenciação sexual dos embriões, ou seja, a temperatura mais importante para a determinação do sexo durante o processo de incubação é a que for sentida pelos embriões durante o TSP. As mudanças de temperaturas experimentadas antes e depois desse período podem afetar a taxa de desenvolvimento, mas não exercerá influência sobre a diferenciação gonadal dos embriões (Bull, 1980; Yntema & Mrosovsky, 1982, Bull, 1983; Ferreira Júnior, 2009).

A diferenciação sexual é definida como "uma programada cascata de acontecimentos genéticos e hormonais nos quais a gônada indiferente se desenvolve em um testículo ou ovário com o aparelho urogenital e caracteres sexuais secundários apropriados", e determinação sexual como o evento ou gatilho que desencadeia a cascata (Lance, 1997; Greenbaum & Carr, 2002).

Em decorrência do espessamento do tecido mesotélio na região medial do mesonefro, as cristas urogenitais se desenvolvem e dão origem as gônadas (Risley, 1933; Gilbert, 2003; Mc Geady *et al.* 2006; Moore & Persaud, 2008; Fontenele-Neto *et al.*,2012), e dois compartimentos são formados: uma medula interna onde os cordões sexuais primitivos são encontrados independentemente da temperatura e uma camada cortical externa (Ramsey & Crews, 2009). Durante um período do desenvolvimento gonadal o córtex e a medula coexistem (Risley, 1933).No desenvolvimento embrionário, as gônadas de quelônios (testículos e ovários) são formadas a partir de uma gônada indiferenciada ou bissexual, que fornece um embasamento morfológico favorável para a formação tanto de indivíduos machos como fêmeas (Risley, 1933).

Na diferenciação gonadal para a formação de testículo, os túbulos seminíferos se desenvolvem a partir dos cordões medulares ou seminíferos presentes na gônada primordial (Gilbert, 2003). Nesses cordões algumas células epiteliais adquirem características sertólicas e assim os cordões medulares formam o princípio dos cordões seminíferos, com contorno arredondado delimitado por uma membrana basal (Pieau *et al.*, 1999). Para a formação de ovário os cordões sexuais primitivos degeneram, o epitélio germinativo se engrossa devido a proliferação *in situ* de células epiteliais e células germinativas, dando origem aos futuros folículos ovarianos (Pieau *et al.*, 1999; Gilbert, 2003; Moore & Persaud, 2008).

Filhotes de *Podocnemis unifilis* (tracajá) apresentam determinação sexual dependente da temperatura durante a incubação dos ovos (TSD), estando o predomínio de fêmeas ligado a temperaturas mais altas, e a maior quantidade de machos quando os ovos são incubados em temperaturas mais baixas (Souza & Vogt 1994). A temperatura de 32°C foi considerada a pivotal para a incubação da espécie em ninhos com temperaturas constantes (Souza & Vogt, 1994), no entanto, pequenas variações em torno dessa temperatura podem afetar a determinação sexual dos embriões (Bull, 1980; Ferreira Júnior, 2009). Os estudos de Hawkes *et al.* (2007) com *Caretta caretta* na Carolina do Norte, EUA demonstraram que o aumento de 2°C foi suficiente para total feminização dos embriões.

Trabalhos sobre a influência da temperatura na determinação do sexo e a biologia reprodutiva de quelônios têm sido mais frequentes, no entanto pesquisas sobre desenvolvimento e diferenciação sexual ainda são escassas, principalmente no que se refere a espécies Amazônicas. Pesquisas voltadas para descrever a formação e diferenciação gonadal em espécies de quelônios na Amazônia são restritos apenas a dois trabalhos com *P. expansa* (Hildebrand *et al.*, 1997; Magalhães, 2017).

A conservação das espécies de quelônios amazônicos é importante não apenas por manter a diversidade biológica neste bioma, mas também pelo papel histórico e atual destes animais como recurso alimentar e fonte de proteína para as populações ribeirinhas (Vogt, 1994). Diante disso, muitos métodos têm sido usados como medidas de manejo para a conservação de quelônios com intuito de manter, aumentar e/ou recuperar populações em declínio. Sendo elas divididas em *in situ*: proteger o habitat e os animais ou restabelecer o habitat, por meio de leis de proteção, controle de predadores e proteção de áreas de desova; e *ex situ*: ações como a remoção dos ovos do local que foram desovados e a transferência para local protegido, criação de animais em cativeiros e *headstarting* (manter filhotes recém-nascidos em viveiros, com o objetivo de permitir o crescimento dos mesmos até um tamanho em que estejam menos vulneráveis a predadores) (Vismara, 2010).

Entretanto, para o desenvolvimento eficiente dos métodos de conservação dos quelônios amazônicos, é necessário o conhecimento acerca da biologia reprodutiva, bem como da influência da temperatura no desenvolvimento e diferenciação gonadal destes. Portanto, a determinação do mecanismo térmico de espécies com TSD, juntamente com estudos morfológicos da caracterização gonadal, são ferramentas que auxiliam em pesquisas para elaboração de estratégias de manejo, incluindo transplantes de ninho e programas de incubação seminatural (Hildebrand, *et al.*, 1997). Diante disso, o presente capítulo teve por objetivo descrever o desenvolvimento e a diferenciação das gônadas de *Podocnemis unifilis* em temperatura controlada.

MATERIAL E MÉTODOS

Processamento e Análise Macroscópica

Foram coletados da incubadora dois ovos diariamente a partir do quarto dia de incubação até o momento da eclosão (60° dia). O embrião foi retirado ovo com auxílio de tesoura cirúrgica e induzidos a morte seguindo o seguinte protocolo: embriões até o 17° de incubação por submersão em Cloridrato de Lidocaína (2%), e posteriormente conforme o crescimento do embrião, volumes entre 0,5 e 2 ml do mesmo anestésico foram administrados por injeção via intraperitoneal (Magalhães *et al.*, 2017). O processamento só era iniciado a partir da certeza de que o embrião já estava morto. Os embriões foram dissecados submersos em solução salina 7,5%, sendo que somente embriões com mais de 17 dias de incubação puderam ser dissecados. Para descrição macroscópica do desenvolvimento e diferenciação gonadal foi realizada documentação fotográfica macroscópica com auxílio de

estereomicroscópio Zeiss (Stemi SV 11) com câmera AxioCamICc 5 acoplada. Embriões de até 16 dias de incubação foram fixados inteiros; entre 17 e 29 dias de incubação foi removido o plastrão ficando exposto o aparelho urogenital para a fixação, e a partir de 30 dias o complexo gônada-mesonefro foi removido e fixado separadamente. Sendo todas as amostras fixadas em solução de bouin. Após 12 horas na solução de bouin a amostra foi lavada em água corrente e armazenada em álcool 70% até o processamento histológico. Os processos foram realizados no Laboratório Temático de Microscopia Eletrônica e Nanotecnologia – LTMN do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Microscopia de Luz

Os embriões de até 16 dias de incubação foram processados inteiros, e os dos dias posteriores apenas o complexo gônada-mesonefro. As amostras passaram pelo processamento histológico seguindo o protocolo de Magalhães (2017): desidratação em série gradual de etanol (80%, 90%, 95% por 15 minutos cada e 100% (2x) por 10 min cada), diafanizados em 3 banhos de Xilol por 5 min cada, e incluídos em paraplast por 1h e 30min. Após isso, foram feitos cortes seriados em 4µm, as lâminas preparadas foram submetidas à técnica de coloração por Hematoxilina-Eosina - HE.

Para análise descritiva do desenvolvimento e diferenciação gonadal imagens das lâminas foram obtidas em microscópio de luz Zeiss, modelo axioplan2 acoplado a câmera axiocamMRc em diferentes aumentos. Para identificação e descrição do desenvolvimento e diferenciação da gônada em testículo ou ovário, características de diferenciação da medula e córtex gonadal foram levadas em consideração (Yntema & Mrosovsky, 1980; Miller & Limpus, 1981; Rimblot *et al.*, 1985; Ceriania & Wyneken, 2008; Magalhães, 2017).

Microscopia eletrônica de transmissão

Gônadas foram separadas e fixadas em solução de Glutaraldeído 2,5% para microscopia eletrônica de transmissão (MET). As amostras foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 100m, pH 7,2 (3 x por 10 minutos cada). Em seguida, foi realizada uma pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão durante 2h, seguido de 3 lavagens em tampão cacodilato de sódio durante 10 minutos cada. Posteriormente, fez-se contrastação *in bloc* com acetato de uranila aquosa a 5%, overnight a 4 °C, seguido por desidratação em séries de etanol graduado de 50%, 70%, 90%, 95%, 100% (2x) durante 10 minutos e óxido de propileno (2x) durante 15 minutos cada. As amostras foram incorporadas em concentrações crescentes de resina Durcupan-ACM Fluka© a 4 °C durante 4 dias e polimerizadas a 60°C

durante 72h. Secções ultrafinas de 70 nm foram preparadas no Ultramicrotomo Reichert OM U3, recolhidos em grades de cobre revestidas por Formvar de 200 Mesh, contrastadas com 5% de acetato de uranila durante 40 minutos seguido por citrato de chumbo a 0,5% durante 10 minutos e visualizadas sobre microscópio eletrônico de varredura MEV VEGA3 – Tescan, que possui suporte para realização de microscopia de transmissão (Magalhães2017).

RESULTADOS

Análises macroscópicas

Macroscopicamente, entre o 17° e 18° dias de incubação (Figura 1A) foi possível observar o início da formação gonadal, que possuía coloração esbranquiçada pouco perceptível, localizada aproximadamente no terço médio da região ventromedial do mesonefro (que nessa fase do desenvolvimento embrionário ocupa quase toda a extensão do embrião), porém não é possível identificar uma separação entre o mesonefro e a gônada. A partir do 19° dia do desenvolvimento uma leve diferenciação entre o mesonefro e gônada já é identificada (Figura 1B), no entanto torna-se claramente evidente no 22° dia de incubação (Figura 1C). Quando também se observa seu formato fusiforme. Entre o 24° e 28° dia a gônada apresenta maior largura, enquanto que o mesonefro diminui de volume em relação ao corpo do embrião (Figura 1D). Do 32° ao 55° o mesonefro vai regredindo em volume e se tornando estreito, enquanto que, no mesmo período a gônada torna-se mais espessa e aumenta o comprimento em relação ao mesonefro, ocupando quase que totalidade do espaço que antes era apenas mesonefro (Figura 1E,F). Entre o 56° e 60° dia de incubação a gônada já está completamente diferenciada e permanece localizada na região ventromedial do mesonefro ocupando um espaço desde o início ao final do comprimento do mesonefro (Figura 5G,H).

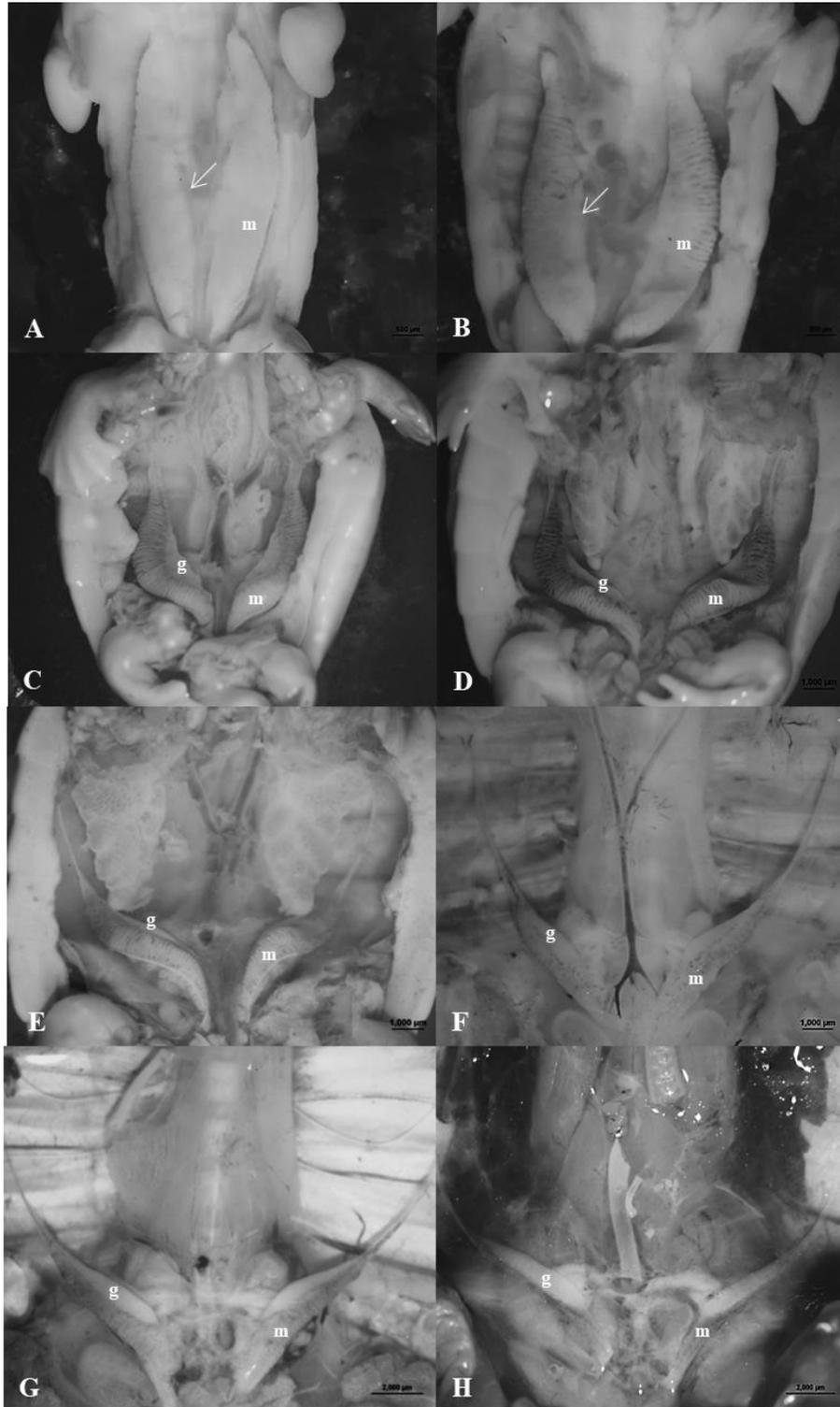


Figura 1: Gônada durante o desenvolvimento embrionário em *P. unifilis*. **A)** 17 dias de incubação; **B)** 20 dias de incubação; **C)** 24 dias de incubação; **D)** 27 dias de incubação; **E)** 30 dias de incubação; **F)** 33 dias de incubação; **G)** 40 dias de incubação; **H)** 58 dias de incubação. *m*: mesonefro, *g*: gônada, *seta*: formação gonadal como uma massa branca na região ventromedial do mesonefro.

Análise Microscópica

De acordo com as análises microscópicas, o desenvolvimento gonadal foi dividido em três etapas: identificação das células germinativas primordiais, estabelecimento da gônada indiferenciada e diferenciação gonadal.

Células germinativas primordiais

Nesse estudo só foi possível observar as células germinativas primordiais (CGP) no 7º dia de incubação, localizadas na região posterior do corpo do embrião, migrando em direção ao mesonefro em desenvolvimento (Figura 2A,B). As CGP foram caracterizadas por serem células grandes e arredondadas, com núcleo grande, pouco citoplasma e nucléolo evidente. Essas células saem do endoderma do saco vitelínico, migram para a mesoderma do intestino posterior e chegam ao mesonefro. Entre o 9º e 11º dia foi visualizado CGP presentes no intestino posterior em desenvolvimento migrando para a região ventromedial do mesonefro, distribuídas em uma camada, e se proliferam nos dias seguinte (Figuras 2C,D,E,F).

A partir do 14º dia de incubação, na região ventromedial do mesonefro, foi observada a proliferação das células germinativas que estavam distribuídas em mais de uma camada, e o aumento das células do estroma gonadal (Figura 2G,H). No 16º dia de incubação foi visível o aumento da espessura da gônada devido a proliferação celular, no qual as CGPs estavam distribuídas em mais de uma camada, aumentando a espessura da gônada em desenvolvimento. Dessa forma, ocorreu o estabelecimento da gônada na região ventromedial do mesonefro.

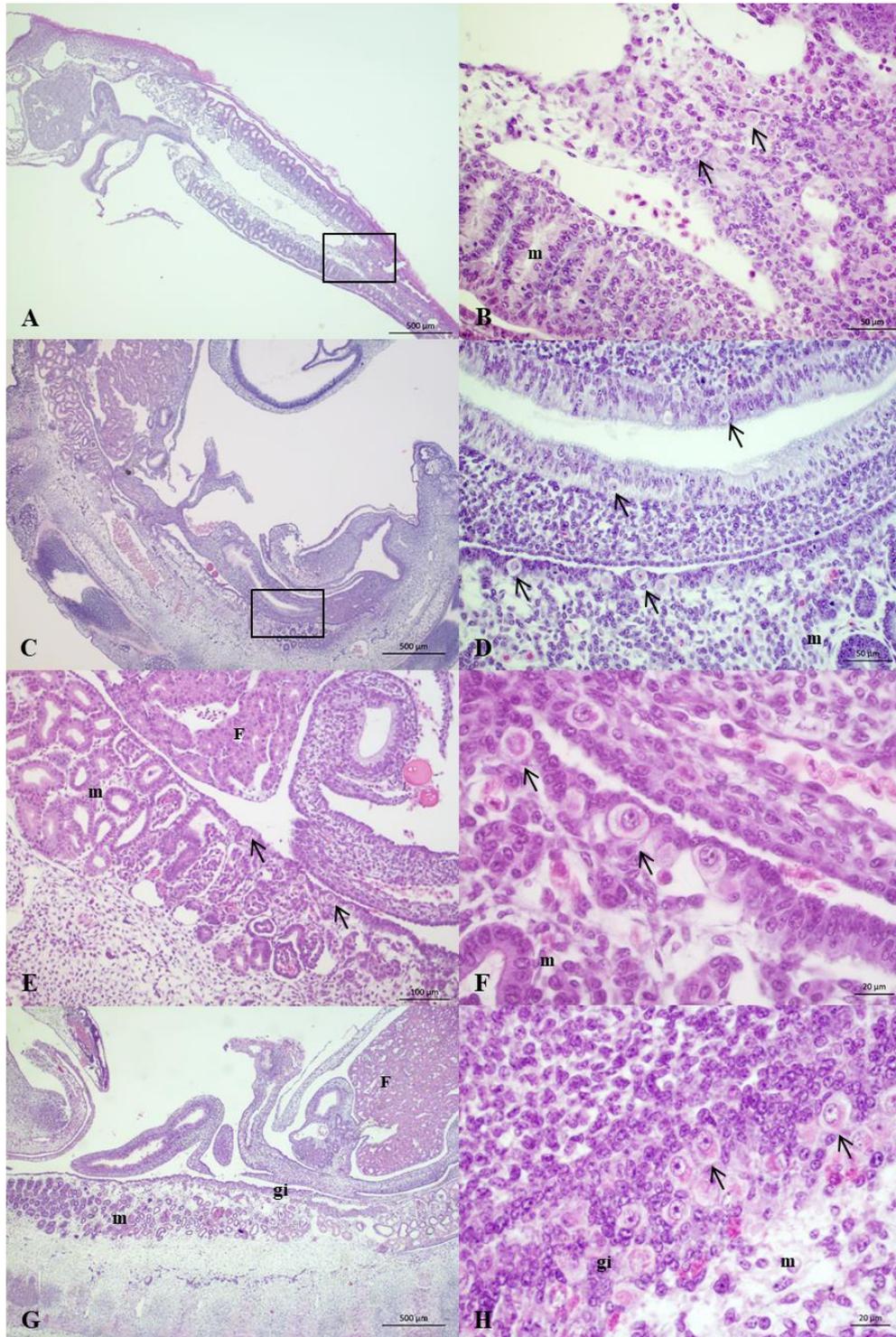


Figura 2: Fotomicrografia de gônadas em diferentes dias de desenvolvimento. **A)** 7º dia do desenvolvimento; **B)** Aumento da área retangular da figura 2A mostrando a área onde as células germinativas primordiais estão localizadas no início do desenvolvimento; **C)** 9º dia do desenvolvimento; **D)** Aumento da área retangular da figura 2C mostrando as células germinativas primordiais migrando para o mesonefro no início do desenvolvimento; **E)** 11º dia de desenvolvimento; **F)** 11º dia do desenvolvimento; **G)** 14º dia do desenvolvimento; **H)** 14º dia do desenvolvimento. *setas* células germinativas primordiais, *m* mesonefro, *gi* gônada inicial.

Gônada indiferenciada

O estabelecimento da gônada indiferenciada ou bipotencial ocorreu quando as CGP se estabeleceram na região ventromedial do mesonefro por volta do 16° dia de incubação. Nos dias que se seguiram ocorreu aumento da espessura da gônada pela presença do estroma altamente celularizado formado por tecido conjuntivo.

A partir do 19° dia do desenvolvimento foi possível observar a localização preferencial das células germinativas na região cortical (Figura 3A). E com 20 dias de incubação duas regiões da gônada indiferenciada se tornam distintas, a camada cortical externa apresentando as CGPs distribuídas ao longo do córtex; e a medula interna no qual os cordões sexuais primitivos foram identificados (Figura 3B,C). As células dos cordões sexuais foram caracterizadas por apresentarem núcleos pequenos e fortemente corados. Foram identificadas células oriundas do mesonefro penetrando no estroma germinativo para auxiliar na formação dos cordões sexuais primitivos (22° dia) (Figura 3D). O epitélio germinativo apresentou-se simples cúbico e com 21 dias invaginações do epitélio começaram a ser identificadas.

No decorrer do desenvolvimento a gônada torna-se mais espessa pela proliferação das CGPs e varias camadas de células germinativas são identificadas no córtex (25° dia) (Figura 3E). A partir do 25° de incubação foi observado aumento das células do estroma e de tecido conjuntivo frouxo entre os cordões sexuais, que ao longo do desenvolvimento apresenta um aumento expressivo (Figura 3F). Com 28 dias os cordões sexuais estão bem organizados e suas células ficaram melhores visualizadas pela presença de núcleos fortemente corados (Figura 3G,H). Além disso, foi possível observar a presença de muito tecido conjuntivo mesenquimal entre eles, deixando os cordões ainda mais em evidência. No decorrer do desenvolvimento o pregueamento do epitélio germinativo diminuiu e foi revestido por epitélio cúbico simples.

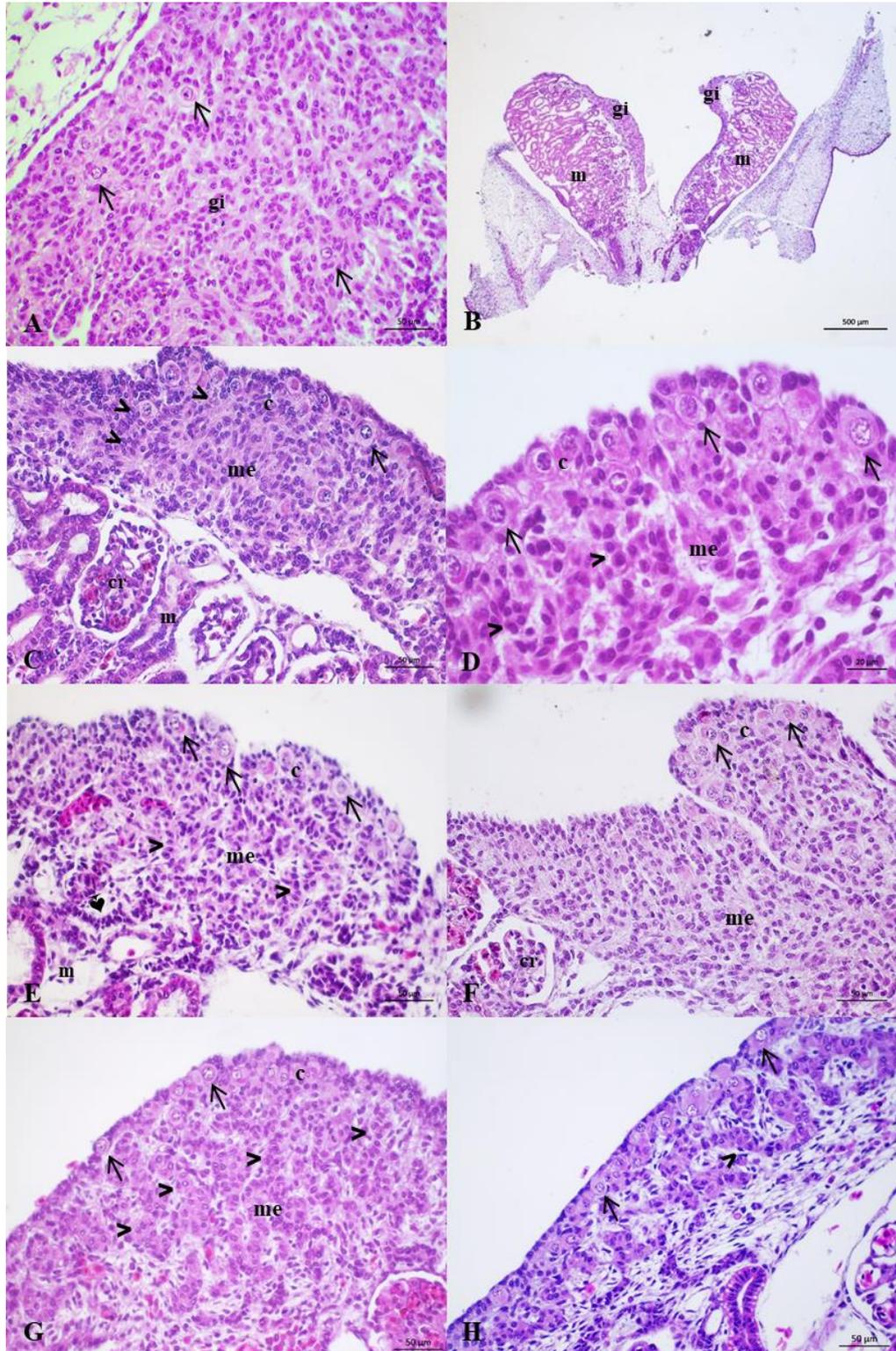


Figura 3: Fotomicrografia de gônadas indiferenciada em diferentes dias de desenvolvimento. **A)** 19° dia do desenvolvimento; **B)** 20° dia do desenvolvimento; **C)** 20° dia do desenvolvimento; **D)** 21° dia do desenvolvimento; **E)** 22° dia de desenvolvimento; **F)** 25° dia do desenvolvimento; **G)** 28° dia do desenvolvimento; **H)** 31° dia do desenvolvimento. *setas* células germinativas primordiais, *m* mesonefro, *gi* gônada inicial, *me* medula, *C* córtex, *cr* corpúsculo renal, *>* cordões sexuais, *♠* células migrando do mesonefro para a gônada.

Diferenciação gonadal

Todos os embriões analisados neste estudo apresentaram a diferenciação gonadal com características de testículo. O início da diferenciação foi visível a partir do 35° dia, apresentando os cordões medulares em início de organização tubular, no entanto as células germinativas ainda estavam presentes no córtex (Figura 4A). No 36° os cordões medulares formavam túbulos mais característicos, deixando em evidência a diferenciação da gônada em testículo (Figura 4B). Tecido conjuntivo foi identificado entre os túbulos seminíferos em formação, caracterizando o tecido intersticial. As células germinativas foram visíveis auxiliando na formação dos túbulos seminíferos (37° dia).

A organização tubular dos cordões sexuais se tornaram mais evidente a partir do dia 38 de incubação e os túbulos seminíferos foram melhores caracterizados (Figura 4C). Foi identificada uma grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo e células mesenquimais entre os túbulos seminíferos, deixando-os bem espaçados entre si. No 39° dia de incubação uma lâmina basal foi levemente visível contornando os túbulos seminíferos (Figura 4D). E com 45 dias essa lamina basal foi claramente identificada, e células achatadas com características de células mioides também foram observadas associada a lâmina basal (Figura 4E,F). Com 51 dias os túbulos seminíferos já estavam melhor organizados (Figura 4G), no entanto as células germinativas ainda foram visíveis nos túbulos auxiliando na sua formação, foi observado até nos indivíduos recém-eclodidos (60° dia) (Figura 4H). Nos indivíduos recém-eclodidos o testículo foi revestido por epitélio cúbico simples sem pregueamento e apresentou túbulos seminíferos formados, no entanto ainda é visível que o processo de diferenciação está ocorrendo. Não conseguimos identificar células de Sertoli nos túbulos seminíferos e nem células de Leydig no tecido conjuntivo intersticial.

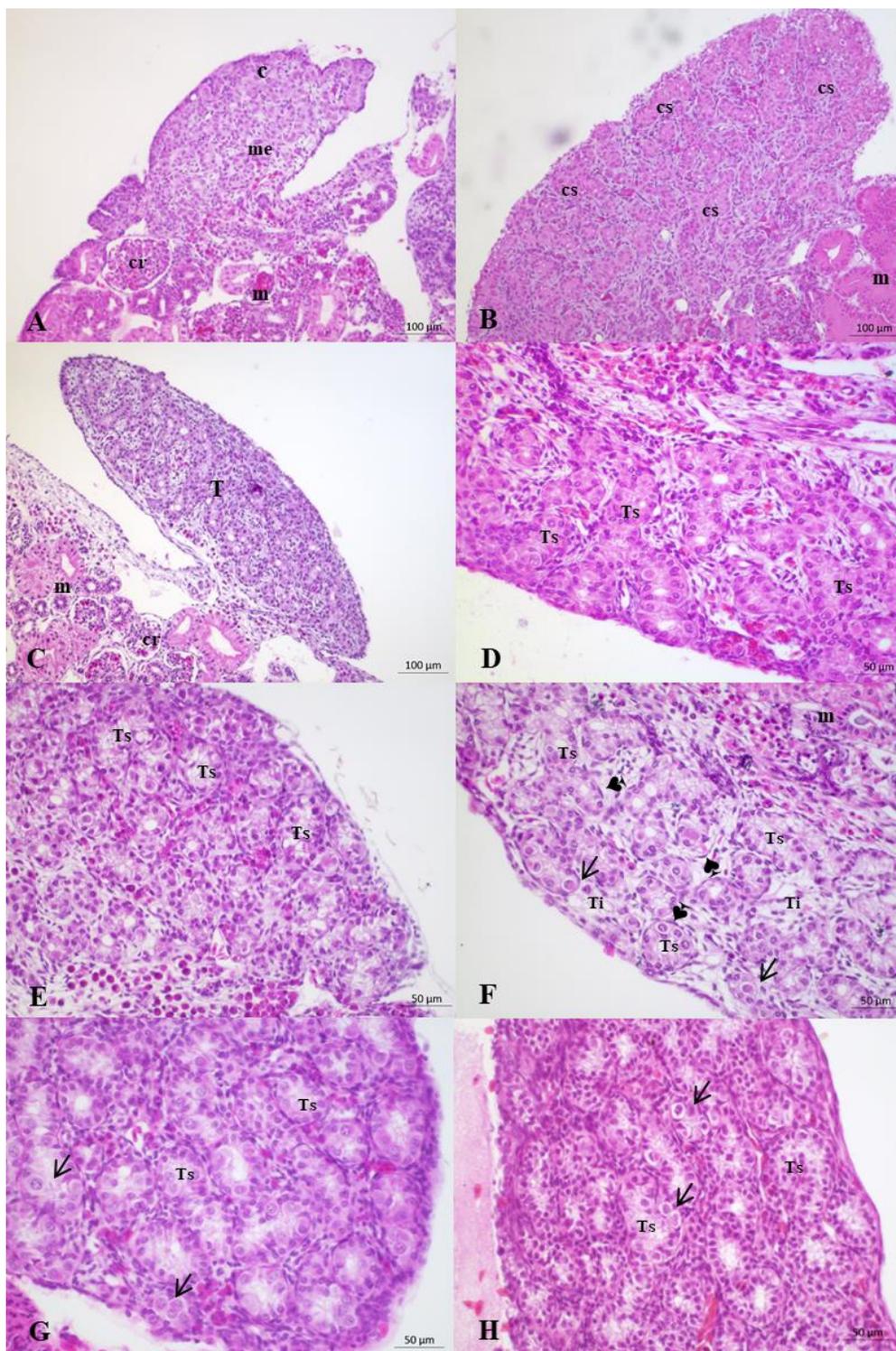


Figura 4: Fotomicrografia de gônadas em diferenciação. **A)** 35° dia do desenvolvimento; **B)** 36° dia do desenvolvimento; **C)** 38° dia do desenvolvimento; **D)** 39° dia do desenvolvimento; **E)** 42° dia de desenvolvimento; **F)** 45° dia do desenvolvimento; **G)** 51° dia do desenvolvimento; **H)** 60° dia do desenvolvimento. *setas* células germinativas primordiais, *m* mesonefro, *me* medula, *C* córtex, *cr* corpúsculo renal, *Cs* cordões seminíferos, *♣* células mioides, *Ts* túbulo seminífero, *Ti* tecido intersticial.

Ultraestrutura testicular

Foram analisadas e microfotografadas testículo do 39° e 47° dia de incubação. O túbulos seminíferos estavam formados (Figura 5A,B), e uma luz foi visualizada no centro do túbulo. No 39° dia do desenvolvimento foi identificada o início da formação da lâmina basal, e com 47 dias essa lâmina basal está melhor evidenciada. Células achatadas com características de células mioides foram identificadas associadas à lâmina basal. (Figura 5C). No tecido conjuntivo intersticial foram observadas células com características de células endócrinas com vesículas lipídicas em seu interior (Figura 5D).

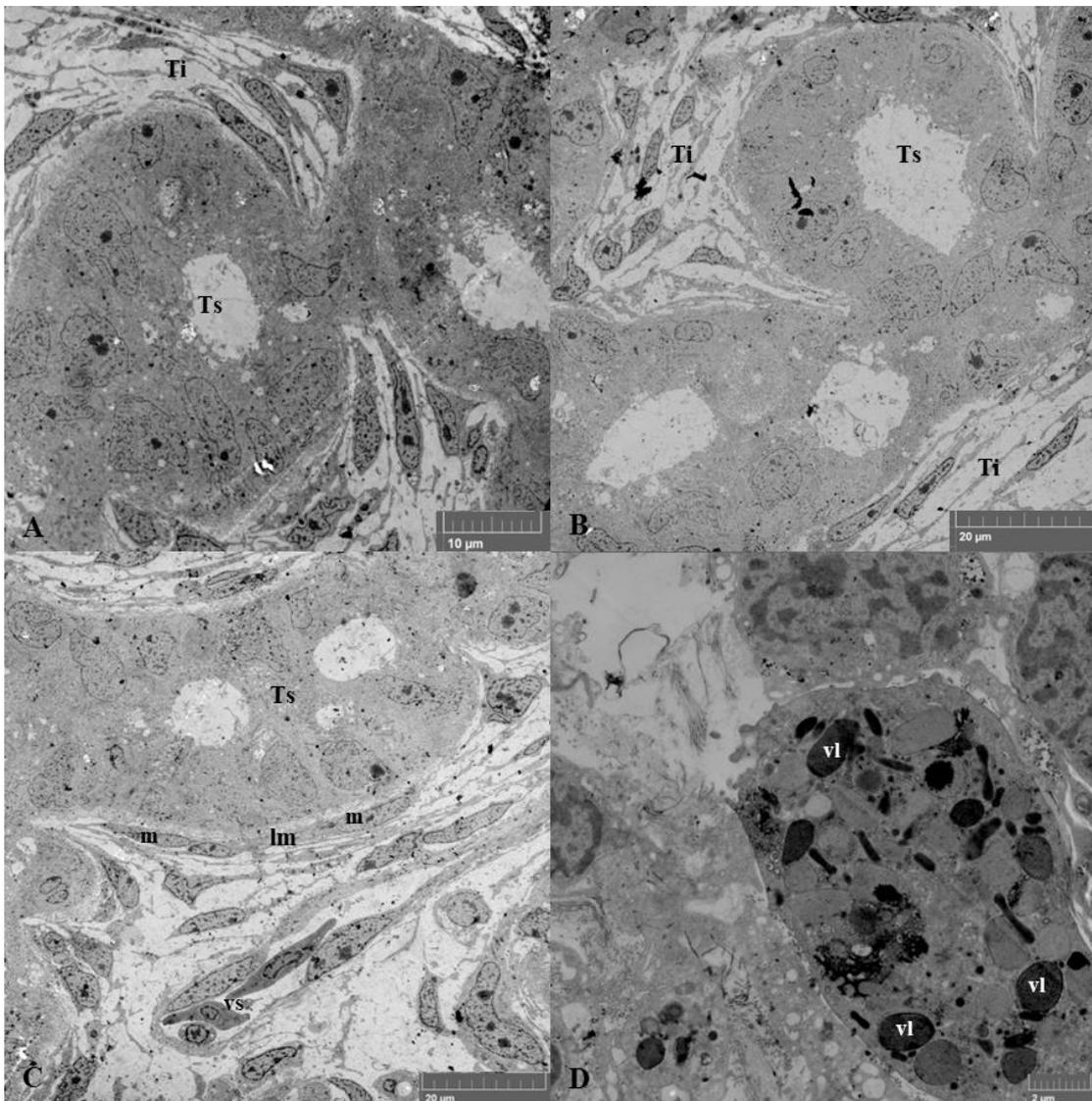


Figura 5: Eletromicrografia de testículo. **A, B,C)** 39° dia de incubação; **D)** 47° dias de incubação. *Ts* túbulo seminífero, *Ti* tecido intersticial, *lm* lamina basal, *m* células mioides, *Vs* vaso sanguíneo, *VL* vesícula lipídica

DISCUSSÃO

No presente estudo, a descrição do desenvolvimento gonadal de *Podocnemis unifilis* foi realizada a temperatura controlada de média de 31,8° C, e foi dividida em três etapas: migração das células germinativas primordiais, estabelecimento da gônada indiferenciada e da diferenciação gonadal. A mesma caracterização foi feita para *S. odoratus* (Risley, 1933), *A. carolinensis* (Forbes, 1956), *L. olivacea* (Merchant-Larios *et al.*, 1989), *P. expansa* (Hildebrand *et al.*, 1997; Magalhães *et al.*, 2017)

O começo do desenvolvimento gonadal em *P. unifilis* ocorreu por meio de um espessamento do epitélio celômico na região ventromedial do mesonefro. Essa característica também foi descrita para varias espécies de répteis (Risley, 1933; Forbes, 1956; Smith & Joss, 1993; Hildebrand *et al.*, 1997; Pieau *et al.*, 1999; Magalhães, 2017).

Em *P. unifilis* só foi possível observar as CGPs com 7 dias de desenvolvimento quando estas alcançaram a porção posterior do corpo do embrião. Já para *P. expansa* (Magalhães, 2017) a visualização das CGPs foi observada no 5° dia de desenvolvimento sendo essas células encontradas na endoderma do saco vitelino. Essa localização foi descrita também para outras espécies: *Sternotherus odoratus* (Risley, 1933), *A. carolinensis* (Forbes, 1956), *C. caretta* (Fujimoto *et al.*, 1979) no período do 5° ao 6° dia de incubação e para *Lepdochelys olivacea* (Merchant-Larios *et al.*, 1989) entre o 10° dia de incubação. Fujimoto *et al.* (1979) destaca que embora a extensão da localização inicial de CGPs varie com a espécie, essa localização é semelhante a outros amniota. A localização das CGPs na fase inicial muitas vezes não é avaliada em profundidade devido à dificuldade de obtenção de espécimes e / ou à falta ferramentas específicas (Magalhães, 2017).

Em embriões de *P. expansa* analisados por Magalhães (2017) foi observado invaginações do epitélio pela primeira vez no 14° do desenvolvimento e com 20 dias essas invaginações foram mais pronunciadas ao longo de toda gônada, conferindo um aspecto pregueado. Hildebrand *et al.* (1997) destaca também em *P. expansa* essa característica estrutural presente nas gônadas de todos os indivíduos desde os primeiros estádios da gonadogênese e caracterizada por sulcos ou invaginações do epitélio germinativo. Enquanto que, no presente estudo para *P. unifilis* o pregueamento só foi visível por volta do 21° dia de incubação.

Para *P. unifilis* as CGPs estabeleceram na região ventromedial do mesonefro por volta do 16° dia de incubação, dando início a formação da gônada indiferenciada. Em *P. expansa* o

estabelecimento da gônada indiferenciada se deu no 14º dia (Magalhães, 2017). para *S. Odoratus*, o início da gonadogênese deu-se por uma rápida proliferação do epitélio germinal na superfície ventromedial do mesonefro para formar a crista germinal (Risley, 1933). Em *P. unifilis* foi visualizado que na gônada indiferenciada, duas regiões são definidas, a região cortical externa caracterizada pela presença das CGPs, e região medular interna no qual os cordões sexuais são encontrados. Essa característica também foi descrita para *P. Expansa* (Magalhães, 2017) e para outras espécies de répteis (Risley, 1933; Hildebrand *et al.*, 1997; Pieau *et al.*, 1999; Ramsey & Crews, 2009). Durante esse período da gônada indiferenciada, células em migração oriundas do mesonefro para a região medular foram observadas. Essa migração celular também foi descrita para *P. expansa* (Magalhães, 2017). Células que proliferam a partir da cápsula de Bowman e do epitélio celômico dão origem a cordões retilíneos (retécords) e poderiam contribuir de forma limitada para a edificação de cordões medulares testiculares e ovarianos (Pieau *et al.*, 1999).

As mudanças observadas nas gônadas de *P. unifilis* durante o período de diferenciação foram similares as registradas para *P. expansa* (Hildebrand *et al.*, 1997, Magalhães, 2017), *E. orbicularis* (Pieau, 1974), *S. odoratus* (Risley, 1933) e para répteis em geral (Raynaud & Pieau, 1985; Pieau *et al.*, 1999). Em *P. expansa* de acordo com Hildebrand *et al.*, (1997) e Magalhães (2017) a diferenciação se iniciou por volta do 35º dia de incubação. No presente estudo, apesar da temperatura de incubação ser diferente, e da incubação ser artificial o início da diferenciação gonadal em *P. unifilis* também foi observada aproximadamente no 35º dia do desenvolvimento. No entanto, só foi observada a diferenciação gonadal para testículo.

Na diferenciação dos testículos em *P. unifilis* é observado que o epitélio tem aspecto liso, semelhante ao observado para *P. expansa* (Hildebrand *et al.*, 1997; Magalhães, 2017), onde as invaginações presentes no epitélio durante a etapa da gônada indiferenciada desaparecem no testículo, e que o epitélio se reduz a uma camada de células, de aspecto liso e ausente de células germinativas. Nessa etapa dois processos ocorrem concomitantemente, o crescimento e diferenciação dos cordões sexuais em túbulos seminíferos, e a redução e o desaparecimento quase completo do córtex (Risley, 1933).

Na formação do testículo ocorreu uma organização dos cordões medulares até estarem na disposição final típica dos túbulos seminíferos, e as células germinativas presentes no epitélio germinativo migraram entre as células epiteliais dos cordões medulares para auxiliar na formação dos túbulos seminíferos. Os primórdios dos túbulos seminíferos passam a ser contornados por uma membrana basal com células mióides associadas (Smith & Joss, 1993).

No nosso estudo, CGP foram identificadas auxiliando na formação dos túbulos seminíferos até em indivíduos recém eclodidos. Estudos destacam que é comum ainda encontrar CGP dentro dos túbulos seminíferos (Risley, 1933; Hildebrand *et al.*, 1997; Pieau *et al.*, 1999). Em nossos achados foi observado que mesmo sendo incubados na mesma temperatura, alguns indivíduos se diferenciam em tempos diferentes, ou seja, indivíduos com mais dias de incubação em alguns casos estavam menos diferenciados que indivíduos com menos dias de incubação.

Apesar do trabalho de Souza & Vogt (1994) estimarem para *P. unifilis* a temperatura pivotal, temperatura que determina uma razão sexual de 1:1, de 32° C, em nosso estudo todos os indivíduos analisados a gônada se diferenciou em testículo. Portanto, nesse estudo foi observado que a temperatura de 31,8° C, mesmo sendo próxima da temperatura pivotal descrita, gerou apenas macho. A Amazônia vem passando por intenso desequilíbrio natural pela ação antropogênica, como o aumento da emissão de gases de efeito estufa, de queimadas, com o desmatamento, a formação de ilhas urbanas de calor, entre outros. O uso da terra e as mudanças de uso da terra na Amazônia afetam as mudanças climáticas (Fearnside, 2007) o que reduz a evapotranspiração, sobretudo na época seca, assim diminuindo o suprimento de água para a atmosfera (Lean *et al.*, 1996; Shukla *et al.*, 1990). Portanto, essas mudanças climáticas podem estar influenciando nas temperaturas que determinam a formação de macho, ou de fêmea e a temperatura pivotal das espécies com TSD. Quando o desenvolvimento embrionário ocorre em temperaturas próximas a pivotal, pequenas diferenças de 1° C a 2° C são suficientes para alterar a razão sexual dos embriões (Yntema & Mrosovsky, 1982). A amplitude da zona de transição da temperatura, em que machos e fêmeas são gerados, é muito variável, como nas tartarugas marinhas *Natator depressuse*, *Dermochelys coriacea* (Hewavisenthi & Parmenter, 2000) que é de menos de 1° C, já para *Chelonia mydas* fica em torno de 4 °C (Mrosovsky *et al.*, 1984).

A seleção natural favorece a TDS quando um indivíduo é fortemente influenciado pelas condições ambientais e quando ele tem pequeno controle sobre as condições ambientais (Charnov & Bull, 1977). Experimentos conduzidos em laboratório por Conover *et al.* (1992) mostraram que uma razão sexual diretamente favorável a um determinado sexo de *Menidia menidia*, um peixe marinho comum com TDS, pode ser reequilibrada pelas gerações futuras. Variações adaptativas da TDS seriam capazes de evoluir em resposta à seleção, como postulado pelo princípio de Charnov-Bull que fala de como a aptidão varia de acordo com condições ambientais (Bull & Charnov, 1989; Mrosovsky, 1994).

Apesar da frequência de TSD em vertebrados amniotas e esforços substanciais de pesquisa, esclarecendo a dinâmica evolutiva dos mecanismos de determinação do sexo (SDMs) neste grupo ainda continua sendo um desafio considerável. Os grupos de amniotas vertebrados que possuem TSD (por exemplo, tartarugas de água doce, tartarugas marinhas e crocodilianos) são frequentemente ameaçados pelas rápidas mudanças climáticas e de habitat que podem afetar os ambientes térmicos dos ninhos e, portanto, as razões de sexo dos filhotes.

CONCLUSÃO

As etapas de diferenciação gonadal foram semelhantes a outras espécies de quelônios com TSD, no entanto não foi possível descrever como ocorre a diferenciação da gônada em ovário para esta espécie sendo necessário que mais estudos precisam sejam realizados com diferentes temperaturas para compreender os mecanismos de determinação do sexo em *Podocnemis unifilis*.

REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, R. A. (1997) The nest environment and the embryonic development of sea Turtles. In: Lutz, P.L.; Musick, J.A. (Eds.). *The Biology of Sea Turtles*. Boca Raton, CRC Marine Science Series.. p. 83-108.
- BULL, J. J. (1980) Sex determination in reptiles. *Quart Rev Biol*, 55:3-21.
- BULL JJ, VOGT RC. (1981) Temperature-sensitive periods of sex determination in Emydid turtles. *J Exp Zool*, 218:435-440.
- BULL, J.J.; Charnov, E.L. (1989) Enigmatic reptilian sex ratios. *Evolution*, 43(7): 1561-1566.
- CHARNOV, E.L.; BULL, J.J. (1977). When is sex environmentally determined? *Nature*, 266(5605): 828-830.
- CONOVER, D.O.; VAN VOORHEES, D.A.; EHTISHAM, A. (1992) Sex ratio selection and evolution of environmental sex determination in laboratory populations of *Menidia menidia*. *Evolution*, 46(6): 1722-1730.
- EWERT, M.A.; NELSON, C.E. (1991) Sex determination in turtles: diverse patterns and some possible adaptive values. *Copeia*, 1991(1): 50-68.
- FERREIRA-JUNIOR, P. D. (2003) Influência dos processos sedimentológicos e geomorfológicos na escolha das áreas de nidificação de *Podocnemis expansa* (tartarugada- amazônia) e *Podocnemis unifilis* (tracajá) na bacia do Rio Araguaia. Tese

- (Doutorado, Departamento de Geologia). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais. 296p.
- FERREIRA JÚNIOR, P. D. (2009) Aspectos Ecológicos da Determinação Sexual em Tartarugas. *Acta Amazonica*, vol. 39(1): 139 – 154.
- FEARNSIDE, P.M. 2007. Uso da terra na Amazônia e as mudanças climáticas globais. *Brazilian Journal of Ecology* 10(2): 83-100.
- FONTENELE-NETO, D. J. *et al.*, (2012) Morfofisiologia da reprodução das aves: desenvolvimento embrionário, anatomia e histologia do Sistema Reprodutor. *Acta Veterinária* 6 (3): 165-176.
- FORBES TR. (1956) The development of the reproductive system of a lizard, *Anolis carolinensis*. *Amer J Anat*, 98:139-158.
- GILBERT, S.F. *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 7, USA. 2003.
- GREENBAUM E, CARR JL (2002) Staging criteria for embryos of the spiny softshell turtle, *Apalone spinifera* (Testudines: Trionychidae). *J Morphol* 254:272–291
- HAWKES LA, BRODERICK AC, GODFREY MH, GODLEY BJ. (2007) Investigating the potential impacts of climate change on a marine turtle population. *Global Change Biology*, 13(5): 923-932.
- HILDEBRAND, P. V.; BERMUDEZ, N.; PEÑUELA, M. C. (1997) La Tortuga Charapa (*Podocnemis expansa*) em el bajo rio Caquetamazonas, Colombia: Aspectos de la Biología reproductiva y Tecnicas para sua manejo. Colombia: Disloque Editora. 1ª ed.
- LANCE V. (1997) Sex Determination in reptiles: an update. *American Zoologist*, 37:504-513.
- LEAN, J., BUNTON, C.B., NOBRE, C.A., ROWNTREE, P.R (1996). The simulated impact of Amazonian deforestation on climate using measured ABRACOS vegetation characteristics. In: Gash, J.H.C.; Nobre, C.A. Roberts, J.M.; Victoria, R.L. (eds.) *Amazonian Deforestation and Climate*. Wiley, Chichester, Reino Unido, p. 549-576.
- MAGALHÃES, M. S. (2017) Desenvolvimento embrionário de *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae): descrição do pronefro e mesonefro e diferenciação gonadal em ambiente natural, Balbina, Amazonas. Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus.
- MERCHANT-LARIOS, H.; FIERRO, I. V.; URRUIZA, B. C. (1989) Gonadal morphogenesis under controll ed temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpetological Monographs*, 3:43-61.

- MILLER, D.; SUMMERS, J.; SILBER, S. (2004) Environmental versus genetic sex determination: a possible factor in dinosaur extinction. *Fertil and Steril*, 81: 954-964.
- MILLER JD, LIMPUS CJ. (1981) Incubation period and sexual differentiation in the green turtle *Chelonia mydas* L. *Proc. Melbourne Herp. Symp.* p. 66-73.
- MOORE, K. L & PERSAUD, T. V. N. (2008) *Embriologia Básica*. Elsevier Brasil.
- MCGEADY, T. A., QUINN, P. J., FITZPATRICK, E. S. & RYAN, M. T. (2006) *Veterinary Embryology*. Blackwell Publishing, Oxford: 392.
- MROSOVSKY, N.; DUTTON, P.H.; WHITMORE, C.P. (1984) Sex ratio of two species of sea turtle nesting in Suriname. *Can. J. Zool.*, 62(11): 2227-2239.
- MROSOVSKY, N.; PROVANCHA, J. (1989) Sex ratio of loggerhead sea turtles hatching on a Florida beach. *Can. J. Zool.*, 67: 2533-2539.
- MROSOVSKY, N. (1994) Sex ratios of sea turtles. *J. Exp. Zool.*, 270(1): 16-27.
- NARO-MACIEL, E.; MROSOVSKY, N.; MARCOVALDI, M. A. (1999) Thermal profiles of sea turtle hatcheries and nesting areas at Praia do Forte, Brazil. *Chel. Conserv. Biol.*, 3(3): 407-413.
- PIEAU C. (1974) Differentiation du sexe en fonction de la temperature chez les embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chelonien): effets des hormones sexuelles. *Ann Embryol Morphog*, 7:365-394.
- PIEAU, C.; DORIZZI, M.; RICHARD-MERCIER, N. (1999) Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, v. 55, p. 887–900.
- RAMSEY M, CREWS D. (2009) Steroid signaling and temperature-dependent sex determination - Reviewing the evidence for early action of estrogen during ovarian determination in turtles. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20:283-292.
- RISLEY PL. (1933) Contributions on the development of the reproductive system in the musk turtle, *Sternotherus odoratus* (Latreille) II. Gonadogenesis and sex differentiation. *Zeitschr. Zellforschung Mikr Anat*, 18:493-543.
- RIMBLOT, F.; FRETEY, J.; MROSOVSKY, N.; LESCURE, J.; PIEAU, C. (1985) Sexual differentiation as a function of the incubation temperature of eggs in the sea-turtle *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1761). *Amphibia-Reptilia* 6: 83-92.
- RHEN T, FAGERLIE R, SCHROEDER A, CROSSLEY DA, LANG JW (2015) Molecular and morphological differentiation of testes and ovaries in relation to the

- thermosensitive period of gonad development in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Differentiation*, 89:31-41.
- SHUKLA, J., NOBRE C.A., SELLERS, P. (1990). Amazon deforestation and climate change. *Science* 247: 1322-1325.
- SOUZA, R. R.; VOGT, R. C. (1994) Incubation temperature influences sex and hatchling size in the Neotropical turtle *Podocnemis unifilis*. *Journal of Herpetology*, 28(4):453-464.
- SMITH CA, JOSS JMP. (1993). Gonadal sex differentiation in *Alligator mississippiensis*, a species with temperature dependent sex determination. *Cell Tissue Res.*273:149-162.
- YNTEMA, C. L.; MROSOVSKY, N. (1982) Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead turtles. *Canadian Journal of Zoology*, 60:1012-1016.
- VISMARA, M. R. (2010) Influência do manejo de ninhos de *Podocnemis unifilis* sobre o desenvolvimento de embriões no Lago Erepecu, REBIO - Trombetas (PA). Dissertação (mestrado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus.
- VOGT, R. C. (1994) Temperature controlled sex determination as a tool for turtle conservation. *Chelonian Conservation and Biology*, 1(2):159-162.

ANEXO 1

 Standard Event System for Vertebrate Embryology				
species (group)		stage/specimen		specimen/stage No.
		breeding temp.		collection No.
		age (days)		sheet No.

CC	SEC	SE	↓	CC	SEC	SE	↓
egg	V01a	egg lay		scales/etc.	V13a	head scales	
blastula	V02a	blastoporus			V13b	throat scales	
neural tube	V03a	primitive streak			V13c	eyelid scales	
	V03b	neural folds closure			V13d	neck scales	
	V03c	anterior neuropore closed			V13e	back scales	
	V03d	posterior neuropore closed			V13f	limb scales	
somites	V04a	somites hard count			V13g	whole forelimb scales	
	V04b	1-5 somite pairs			V13h	tail scales	
	V04c	6-10 somite pairs			V13i	carapace scutes	
	V04d	11-15 somite pairs			hatch	V14a	hatch
	V04e	16-20 somite pairs		maxillary process	G01a	max bud	
	V04f	21-25 somite pairs			G01b	max posterior eye	
	V04g	26-30 somite pairs			G01c	max midline eye	
	V04h	31-35 somite pairs			G01d	max anterior lens	
	V04i	36-40 somite pairs			G01e	max anterior eye	
	V04j	41-45 somite pairs			G01f	max frontonasal fuse	
head	V04k	46-50 somite pairs		mandibular process	G02a	mand arch bud	
	V05a	head bulbus			G02b	mand posterior eye	
	V05b	anterior cephalic projection			G02c	mand posterior lens	
nose	V05c	head projection disappeared			G02d	mand midline eye	
	V06a	olfactory pit			G02e	mand anterior lens	
ear	V06b	external nares			G02f	mand anterior eye	
	V07a	otic pit			G02g	mand level frontonasal	

	V07b	otic vesicle			G02g	mand occlusion point	
	V07c	otic capsule inconspicuous			G03a	2nd arch	
eye	V08a	optic vesicle		pharyngeal arches	G03b	3rd arch	
	V08b	lens vesicle			G03c	4th arch	
	V08c	optic fissure			G03d	5th arch	
	V08d	contour lens/iris			G03e	hyoid flap	
	V08e	pupil forms			pharyngeal slits	G04a	1st slit
	V08f	scleral papillae		G04b		2nd slit	
	V08g	scleral papillae inconspicuous		G04c		3rd slit	
ribs	V09a	rib primordia			G04d	4th slit	
heart	V10a	Ventricle bulbus			G04e	slits closed	
	V10b	thoracal bulbus disappeared		urogenital papillae	G05a	urogenital papilla bud	
	V10c	ventricle S-shaped			G05b	urogenital papilla inconspicuous	
tail	V11a	tail bud		neck	T01a	cervical flexure 90°	
limbs	V12a	forelimb ridge			T01b	cervical flexure disappeared	
	V12b	forelimb bud			T01c	wrinkles on neck	
	V12c	forelimb elongated		eye lids	A01a	lower lid	
	V12d	forelimb AER			A01b	eyelid begun overgrow	
	V12e	hindlimb AER			A01c	eyelid at scleral papillae	
	V12f	forelimb elbow			A01d	eyelid ventral lens	
	V12g	forelimb paddle			A01e	eyelid half eye	
	V12h	hindlimb paddle			A01f	membrana nictitans	
	V12i	forelimb digital plate		caruncle	A02a	caruncle	
	V12j	hindlimb digital plate		ramphothecae	S01a	ramphothecae	
	V12k	digital grooves		carapace	S02a	carapacial ridge	
	V12l	digital serration			S02b	longitudinal carapacial ridge	
V12m	finger		S02c		carapace not anterior		
V12n	first claw		S02d		carapace clearly limited		
Legend: ↓ = mark the existing characters here as x					S02e	carapace beyond tail	
					S02f	carapace irregular	
notes							



Standard Event System for Vertebrate Embryology

species (group)	stage/specimen		specimen/stage No.	
<i>Podocnemis unifilis</i>	breeding temp.		collection No.	
	age (days)		sheet No.	

drawings / photographs / references	

Fig. F1:



Standard Event System for Vertebrate Embryology

species (group)	stage/specimen		specimen/stage No.	
	breeding temp.		collection No.	
	age (days)		sheet No.	/

drawings / photographs / references

A large empty rectangular box intended for drawings, photographs, or references.