



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

EMANUEL LUCAS BEZERRA ROCHA

**MORFOLOGIA DA GÔNADA DE FILHOTES NATIMORTOS DE  
TARTARUGA-DE-PENTE (*Eremochelys imbricata*)**

MOSSORÓ

2021

EMANUEL LUCAS BEZERRA ROCHA

**MORFOLOGIA DA GÔNADA DE FILHOTES NATIMORTOS DE  
TARTARUGA-DE-PENTE (*Eretmochelys imbricata*)**

Dissertação apresentada ao Mestrado em  
Ciência Animal do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência Animal da  
Universidade Federal Rural do Semi-  
Árido para a obtenção do título de mestre

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e  
Biotecnologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo  
Bezerra de Moura

MOSSORÓ

2021

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

R672m Rocha, Emanuel Lucas Bezerra.  
MORFOLOGIA DA GÔNADA DE FILHOTES NATIMORTOS DE  
TARTARUGA-DE-PENTE (*Eretmochelys imbricata*) /  
Emanuel Lucas Bezerra Rocha. - 2021.  
67 f. : il.

Orientador: Carlos Eduardo Bezerra de Moura.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal  
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em  
Ciência Animal, 2021.

1. Histologia. 2. Ultraestrutura. 3. Ovário.  
4. Testículo. 5. Testundines . I. de Moura, Carlos  
Eduardo Bezerra , orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

**MORFOLOGIA DA GÔNADA DE FILHOTES NATIMORTOS DE  
TARTARUGA-DE-PENTE (*Eretmochelys imbricata*)**

Dissertação apresentada ao Mestrado em  
Ciência Animal do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência Animal da  
Universidade Federal Rural do Semi-  
Árido para a obtenção do título de meste

**Linha de Pesquisa:** Morfofisiologia e  
Biotecnologia Animal

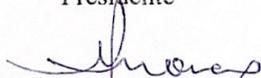
Defendida em: 17/03/2021.

**BANCA EXAMINADORA**



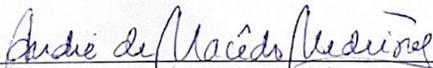
---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura (UFERSA)  
Presidente



---

Prof. Dr. Moacir Franco Oliveira (UFERSA)  
Membro Examinador



---

Prof. Dr. André de Macêdo Medeiros (UFERSA)  
Membro Examinador

*In memoriam* Maria Marina de Oliveira Rocha (mãe de coração).

Dedico este trabalho ao meu pai Valdete Bezerra Rocha Junior e  
minha mãe Maria Osanilda de Oliveira Rocha.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus** que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos na academia, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

Agradeço ao mundo por mudar as coisas, por nunca fazê-las serem da mesma forma, pois assim não teríamos o que pesquisar, o que descobrir e o que fazer, pois através disto consegui concluir a minha dissertação.

Dediquei este trabalho “*in memoriam*” a minha mãe de coração **Maria Marina de Oliveira Rocha** e aproveitei também para agradecê-la, esteja onde estiver. Lembro-me de ela dizer que a maior virtude do homem é saber ler e escrever.

Agradeço a minha mãe **Maria Osanilda de Oliveira Rocha**, heroína que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. E como referência de professora e mulher.

Ao meu pai **Valdete Bezerra Rocha Junior** que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu e que para mim foi muito importante.

Agradeço também aos meus irmãos, **Maria Alderlene de Oliveira, Soraia Cristina de Oliveira, Valdete Bezerra Rocha Neto e Emanuely Thamilles Bezerra Rocha**, que embora não tivessem conhecimento disto, mas iluminaram de maneira especial os meus pensamentos me levando a buscar mais conhecimentos.

A minha irmã de coração **Gildene de Oliveira Rocha**, por sempre me motivar a continuar crescendo.

Ao meu orientador **Carlos Eduardo Bezerra de Moura** pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desse trabalho. Saliento o apoio incondicional prestado, a forma interessada, extraordinária e pertinente como acompanhou a realização deste trabalho. As suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de toda a jornada. Não posso esquecer a sua grande contribuição para o meu crescimento como investigador, pesquisador e pessoa. Eternamente grato por todo o apoio.

A **Marcela dos Santos Magalhães** por dividir seu amor por tartarugas, por me ensinar e incentivar a seguir essa área. Exemplo de pesquisadora e mulher.

Ao meu amigo **Marco Antônio Diodato** Companheiro de Caminhada. Eu posso dizer que meu crescimento pessoal e profissional, não teria sido a mesma sem a sua pessoa.

A **Vanessa Silva Santana**, minha pessoa preferida, pesquisadora, veterinária e nas horas livres conselheira. Sem você essa etapa não teria sido a mesma. Obrigado por sempre está lá por mim.

Ao meu amigo **Hélio Norberto de Araújo Júnior**, que conheci na pós-graduação e que pretendo levar para minha vida. Esse homem é um exemplo de homem. Um ser iluminado que me ajudou tanto no aprimoramento do meu conhecimento sobre morfologia, como foi luz nos momentos de angústias e incertezas.

Ao colega **Igor Remo Guimarães Lopes**, por seu apoio tanto no laboratório, como nos conselhos nas horas difíceis.

A minha colega **Ana Indira Bezerra Barros Gadelha**, por manter minha paz de espírito no laboratório.

Ao **Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada** (LABMORFA/UFERSA, responsável: **Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira**) pela disponibilidade da infraestrutura física.

Ao **Laboratório de Anatomia dos Animais Domésticos**, por servir como estrutura para meu estágio docência e assim contribuir no meu crescimento de ensino.

Agradeço também a todos **os alunos de veterinária do 2019.1 e 2019.2**, por contribuir na minha experiência na docência da disciplina de anatomia dos animais domésticos I e II.

A **Associação de Proteção e Conservação Ambiental Cabo de São Roque** por aceitar o convite de parceria e por disponibilizar o material para o estudo em questão.

A **Lucas Gabriel Verissimo Pinheiro da Silva e Isadora Nathalia Rocha Barreto** pesquisadores incríveis e que batalham a cada dia em busca da proteção e conservação das tartarugas marinhas

Ao **Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia**, por sua colaboração nas análises de microscopia eletrônica de transmissão.

A **Lucas Castanhola Dias**, por sua amizade e paciência para repassar seu conhecimento sobre microscopia.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo suporte financeiro, tornando possível a realização do trabalho.

**A Universidade Federal do Semi-Árido (UFERSA), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), por possibilitarem a realização do trabalho.**

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, não sou o que irei ser, mas Graças a Deus, não sou o que eu era”.

(Martin Luther King)

## RESUMO

As alterações climáticas são consideradas grande ameaça à biodiversidade global. As tartarugas de pente (*Eretmochely imbricata*) são as mais criticamente ameaçadas dentre as espécies que desovam o litoral do Rio Grande do Norte. Sabendo que as tartarugas marinhas exibem sua determinação sexual dependente da temperatura, são consideradas vulneráveis a mudanças nos regimes térmicos. Assim, o presente estudo tem como objetivo caracterizar a morfologia das gônadas de filhotes natimortos de tartaruga-de-pente. Os animais foram coletados na praia de Cabo de São Roque, Município de Barra de Maxaranguape. Após a coleta, retirou-se o plastrão, onde foi possível a identificação e dissecação do complexo gônada-mesonefro (CGM). Esse complexo foi submetido a análise macroscópica, posteriormente fragmentando e fixado com paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato por 24h para processamento para microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão (TEM), respectivamente. Verificou-se que as gônadas das fêmeas possuíam um aspecto granuloso, cor esbranquiçada translúcida e forma fusiforme. Já nas gônadas masculinas observou-se uma superfície lisa, com cor branco opaco e formato aproximadamente ovoide. Também foi possível observar maior vascularização na superfície das gônadas das fêmeas em relação aos machos. Os testículos apresentaram a largura direita média de  $63,48 \pm 17,66\mu\text{m}$  e esquerda de  $61,11 \pm 14,96\mu\text{m}$ , enquanto os ovários direito  $71,79 \pm 17,67\mu\text{m}$  e o esquerdo de  $66,86 \pm 20,74\mu\text{m}$  ( $P > 0,05$ ). Na microscopia, foi possível confirmar os sexos dos indivíduos, principalmente, pela diferença da estrutura da medula, onde as fêmeas possuíam celularidade desorganizada, com presença de ovogônias, lacunas e vasos sanguíneos. Os machos apresentaram um padrão organizacional na medula marcado pela presença de túbulos seminíferos em toda sua extensão. No que se refere a ultraestrutura, as fêmeas apresentaram um estroma marcado por uma rede de associação entre vasos sanguíneos, lacunas, fibroblastos, fibras de colágeno, músculo liso, células intersticiais com citoplasma rico em vesículas eletrodensas e células da linha germinativa (ovogônias) que apresentavam forma oval grande, com núcleo conspícuo e não central, citoplasma abundante. Nas masculinas foi possível observar no interior dos túbulos seminíferos, células piramidais com pouca heterocromatina, citoplasma apical aproximadamente triangular e basal com um nucléolo evidente característico de célula de Sertoli (CS). Junto a lâmina basal identificou-se células pavimentosas com características de células mioides (Cm) e no interstício observou-se células com características de função endócrina com vesículas eletrodensas

em seu interior, padrão semelhante a células de Leydig (Ly). As Ly apresentavam núcleo arredondado, heterocromatina distribuída irregularmente e um nucléolo proeminente. Os ductos paramesonéfricos nas fêmeas é revestido por epitélio colunar simples e células cúbicas altas, Já nos machos, apresenta-se revestido por células cúbicas baixa, com perfil elíptico alongada e caracterizado pela ausência de lúmen. Os apêndices nas fêmeas apresentam um anel de ligação com oviduto com uma maior quantidade de células quando comparadas com o anel dos machos. Além disso, a extremidade dos apêndices também apresenta diferenças entre os sexos. Concluiu-se que tanto a avaliação macroscópica, microscópica e ultraestrutural se mostram técnicas efetivas e de confiança para a identificação sexual. Também vale salientar que na ausência das gônadas a análise microscópica dos ductos paramesonéfricos e dos apêndices dos ductos representam uma alternativa para a identificação sexual da espécie em questão.

**Palavras-chave:** Histologia, ultraestrutura, ovário, testículo, testundines

## ABSTRACT

Climate change is considered a major threat to global biodiversity. Hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) are the most critically endangered species that spawn off the coast of Rio Grande do Norte. Knowing that sea turtles exhibit their temperature-dependent sex determination, they are considered vulnerable to changes in thermal regimes. Thus, the present study aims to characterize the gonad morphology of stillborn hawksbill turtle hatchlings. The animals were collected on the beach of Cabo de São Roque, municipality of Barra de Maxaranguape. After collection, the plastron was removed, where it was possible to identify and dissect the gonad-mesonephro complex (GMC). This complex was submitted to macroscopic analysis, later fragmented and fixed with 4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer for 24h for processing for light microscopy and transmission electron microscopy (TEM), respectively. The female gonads were found to have a grainy appearance, translucent whitish color and spindle shape. In the male gonads, a smooth surface was observed, with an opaque white color and an approximately ovoid shape. It was also possible to observe greater vascularization on the surface of the female gonads compared to males. The testicles had an average right width of  $63.48 \pm 17.66\mu\text{m}$  and the left  $61.11 \pm 14.96\mu\text{m}$ , while the right ovaries  $71.79 \pm 17.67\mu\text{m}$  and the left  $66.86 \pm 20.74\mu\text{m}$  ( $P > 0.05$ ). Under microscopy, it was possible to confirm the sex of individuals, mainly due to the difference in the structure of the marrow, where females had disorganized cellularity, with the presence of oogonia, lacunae and blood vessels. Males showed an organizational pattern in the medulla marked by the presence of seminiferous tubules throughout its length. Regarding the ultrastructure, the females presented a stroma marked by a network of association between blood vessels, gaps, fibroblasts, collagen fibers, smooth muscle, interstitial cells with cytoplasm rich in electron-dense vesicles and germline cells (ovogonia) that they had a large oval shape, with a conspicuous rather than a central nucleus, and abundant cytoplasm. In males, it was possible to observe inside the seminiferous tubules, pyramidal cells with little heterochromatin, approximately triangular and basal apical cytoplasm with an evident nucleolus characteristic of Sertoli cells (CS). Along the basal lamina, pavement cells with characteristics of myoid cells (Cm) were identified, and in the interstitium cells with characteristics of endocrine function were observed with electron-dense vesicles inside, a pattern similar to Leydig cells (Ly). Ly had a rounded nucleus, irregularly distributed heterochromatin and a

prominent nucleolus. The paramesonephric ducts in females is lined with simple columnar epithelium and tall cubic cells, whereas in males, it is lined with low cubic cells, with an elongated elliptical profile and characterized by the absence of lumen. The appendages in females have an oviduct-connecting ring with a larger number of cells when compared to the ring in males. In addition, the end of the appendages also differs between sexes. It was concluded that both macroscopic, microscopic and ultrastructural evaluation are effective and reliable techniques for sexual identification. It is also worth noting that in the absence of the gonads, microscopic analysis of the paramesonephric ducts and duct appendages represent an alternative for the sexual identification of the species in question.

**Keywords:** Histology, ultrastructure, ovary, testicle, testudines.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Largura média (média $\pm$ desvio padrão) (Mann-whitney U, com teste de Wilcoxon W a posteriori, comparando a biometria das gônadas e mesonefros de natimortos machos e fêmeas de <i>Eretmochelys imbricata</i> com ( $p < 0,05$ ).....	38
<b>Tabela 2-</b>	Critérios microscópicos de identificação das gônadas e anexos da <i>Eretmochelys imbricata</i> .....	43

## LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1-** *Eretmochelys imbricata* adulta após a desova na praia de cabo de são roque, RN.....23
- Figura 2-** Filhote natimorto de *Eretmochelys imbricata*. **A** (vista dorsal), **B** (vista ventral).....24
- Figura 3-** Atividades desenvolvidas pela Associação de Proteção e Conservação Ambiental Cabo de São Roque, Maxaranguape-RN.....32
- Figura 4-** Mapa da região de coleta na praia de Caraúbas, no município de Maxaranguape, RN (APCA – Cabo de São Roque).....33
- Figura 5-** Abertura de ninho e coleta dos natimortos de *E. imbricata* em Cabo de São Roque (RN).....34
- Figura 6-** Complexo gônada-mesonefro de filhotes natimortos de *Eretmochelys imbricata*. **A:**Vista ventral; **B:** Abertura da cavidade celomática; **C:** Corte transversal do indivíduo.....35
- Figura 7-** Macroscopia das gônadas de uma fêmea (**A**) e um macho (**B**) natimortos de *Eretmochelys imbricata* durante a sexagem.....38
- Figura 8-** Fotomicrografia de gônadas de natimortos de *Eretmochelys imbricata* **A-** Gônada de uma fêmea. **B** – Gônada de um macho. **C** – Gônada de uma fêmea em maior aumento. **D** - Gônada de um macho em maior aumento. **E** – Gônada de fêmea em maior aumento. **F** – Gônada de macho em maior aumento. **C** (Córtex); **M** (Medula); **Lg** (Leito germinativo); **Vs** (Vasos Sanguíneos); **Ov** (Ovogônia); **L** (Lacunas); **Ts** (Túbulos Seminíferos); **CS** (Células de Sertoli); **cM** (Células Mioepiteliais); **Ly** (Células de Leydig; **I** (Interstício); **Mb** (Membrana Basal), Hematoxilina e eosina.....39
- Figura 9-** Fotomicrografia das gônadas de filhote natimortos de *Eretmochelys imbricata* apresentando intersexo. **A** – Gônada de filhote intersexo. **B-** Gônada de filhote intersexo em maior aumento. **E:** epitélio; **M:** medula; **Ts:** Túbulo seminífero; **L** lacuna; **Ov:** Ovogônia.....40
- Figura 10-** Fotomicrografia dos ductos paramesonéfrico de natimortos de *Eretmochelys imbricata* **A-** Ducto de uma fêmea. **B** – Ducto de um macho. **C** – Região central do ducto de uma fêmea. **D** - Região central do ducto de um macho. **E** – Apêndice de uma fêmea. **F** – Apêndice de um macho. **Mt** (Mesentério); **O** (Ducto); **Ap** (Apêndice); **Lu** (Lúmen); **Ca** (Células Cúbicas Altas); **Cb** (Células Cúbicas Baixas), **Al** (Anel de ligação), **Ex** (Extremidade), Hematoxilina e eosina.....42
- Figura 11-** Eletrofotomicrografia de gônadas de machos natimortos de *Eretmochelys imbricata* **A-** Túbulo seminífero. **B-** Célula de Sertoli. **C** – Região testicular. **D** – Interstício. **TS:** (Túbulo seminífero); **CS:** (Célula de Sertoli); **Ly** (Células de Leydig); **Ei** (Espaço intersticial); **Círculo vermelho** (Célula mioide); **Vs:** Vasos sanguíneos.....45

**Figura 12-** Eletrofotomicrografia de gônadas de fêmeas natimortas de *Eretmochelys imbricata* **A-** Região cortical, leito germinativo e estroma. **B** – Estroma. **C-** Estroma. **Ov** (Ovogônias); **CI** (células intersticiais); **Eg** (Epitélio germinativo); **Vs** (Vaso sanguíneo); **F** (Fibroblasto); **Fc** (Fibras de colágeno); **Cs** (Células sanguíneas).....46

## LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

®	Marca registrada
©	Copyright
μ	Micrômetro
°C	Graus celsius
±	Mais ou menos
<	Menor
%	Porcentagem
cm	Centímetro
n/s	Não significativo
nm	Nanômetro
h	Hora
pH	Potencial Hidrogeniônico
kV	Quilovolt
°	Número
APC	Associação de Proteção e Conservação
CGM	Compleco gônada-mesonefro
CGP	Células Germinativas Primordiais
HE	Hematoxilina-Eosina
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
IUCN	International Union for Conservation of Nature
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MMA	Ministério do Meio Ambiente
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
TSD	Determinação sexual dependente de temperatura
TSP	Período termossensível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
2.1	Objetivo Geral.....	21
2.2	Objetivos Específicos.....	21
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
3.1	Tartarugas Marinhas.....	22
3.1.1	<i>Eretmochely imbricata</i> .....	22
3.2	Morfofisiologia do Aparelho urogenital.....	24
3.2.1	Fase Juvenil.....	24
3.2.2	Fase Adulta.....	26
3.3	Influência das Mudanças Climáticas na Reprodução.....	28
3.4	Métodos de Sexagem como ferramenta em estudo com tartarugas marinhas.....	29
3.5	Associação de Proteção e Conservação Ambiental Cabo de São Roque..	31
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1	Local de coleta.....	33
4.2	Animais.....	34
4.3	Macroscopia do complexo gônada-mesonefro (CGM).....	35
4.3.1	Mensuração da largura maior das gônadas e mesonefros.....	35
4.4	Microscopia do complexo gônada-mesonefro (CGM).....	35
4.4.1	Microscopia de luz.....	35
4.4.2	Microscopia de transmissão (MET).....	36
4.5	Análise estatística.....	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
5.1	Macroscopia das gônadas.....	37
5.2	Morfometria das gônadas e mesonefros.....	37
5.3	Microscopia das gônadas.....	38
5.3.1	Gônada.....	38
5.3.2	Ducto paramesonefrico.....	41
5.3.3	Critérios microscópicos de dimorfismo.....	43
5.4	Microscopia eletrônica de transmissão.....	44
5.4.1	Machos.....	44
5.4.2	Fêmeas.....	44
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil a *Eretmochelys imbricata*, é uma espécie conhecida como tartaruga-de-pente, ou tartaruga legítima. Possui distribuição expressiva nos mares tropicais (SANTOS, 2013) e raramente encontrada em mares subtropicais. Apresenta-se criticamente em perigo de extinção tanto no Brasil quanto no exterior, segundo a União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN, 2019).

As áreas de desova e alimentação dessa espécie no Brasil são Norte da Bahia, Sergipe e litoral sul e norte do Rio Grande do Norte (GAVILAN-LEANDRO et al., 2016). O período de desova no Rio Grande do Norte ocorre principalmente de novembro a abril, tendo maior concentração nos meses de janeiro, fevereiro e março (MARCOVALDI et al, 2007; OLIVEIRA, 2018).

Nas espécies de tartarugas marinhas (*Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata*, *Dermochelys coriácea* e *Lepidochelys olivácea*), assim como em outros répteis, as diferenças de temperatura, e não de cromossomos sexuais, coordenam primariamente o desenvolvimento sexual dos embriões (ZHANG et al., 2020). Além disso, não são externamente dimórficas até se aproximar da maturidade sexual, que normalmente ocorre uma década ou mais após a eclosão (CERIANI & WYNEKEN, 2008 GEOFFEY & WAPSRA, 2019).

Há pesquisas sobre determinação sexual em tartarugas marinhas que identificaram um sistema de macho-frio e fêmea-quente, ou seja, onde temperaturas superiores a 29°C determinam o nascimento de mais fêmeas e inferiores a 29° C, mais machos (SWIGS et al., 2018). Já as temperaturas intermediárias estão associadas a uma mudança gradual das razões de sexo masculino para feminino (MUELLER et al., 2019).

A literatura também destaca os impactos potenciais dos efeitos das mudanças climáticas em espécies com determinação do sexo dependente da temperatura (TSD), nas quais os ovos são incubados (SOUZA et al., 2018; KOLANDAIVELOO et al., 2020). No que diz respeito às tartarugas marinhas, a predição mais comum é o aumento do risco de extinção associado a uma predisposição a aumentar o desenvolvimento de fêmeas devido ao aumento da temperatura (BLECHSCHMIDT, et al., 2020). À luz desta previsão, é necessário intensificar os estudos referentes aos padrões do desenvolvimento da morfologia externa e interna para propor estratégias de conservação dessas espécies mediante os efeitos das mudanças climáticas nos próximos anos (FUENTES et al., 2020).

A aferição das temperaturas de ninhos, temperaturas de praia ou duração de incubação e relações empíricas derivadas de dados de laboratório são as práticas comuns para estimar os padrões sexuais em praias de nidificação (MILLER et al., 2020). Vale ressaltar que a temperatura de incubação além de influenciar o sexo, influencia a duração da incubação e o grau de desenvolvimento. Muitos tecidos e órgãos podem mostrar diferentes respostas em relação à temperatura de incubação (BILLET et al., 1985).

Na maioria dos quelônios, o sexo não pode ser identificado com precisão, sendo necessário a utilização de padrões fisiológicos ou pela morfologia externa em recém-eclodidos e jovens. Uma das grandes dificuldades na identificação sexual dos filhotes é a complexidade dos métodos usados na sexagem (VALENZUELA et al., 2004).

Souza e Vogt (1994) utilizaram em *Podocnemis unifilis* a análise da morfologia externa das gônadas e obtiveram um alto nível de correspondência, isto é, análise da morfologia externa das gônadas, com posterior confirmação por meio de estudo histológico, podendo ser utilizado para identificar o sexo dos filhotes recém-eclodidos. Ressaltando a conclusão feita por Yntema (1980) e Vogt (1994), onde os autores afirmam o exame das gônadas em estereoscópio. é o suficiente para identificar o sexo dos filhotes recém-eclodidos em várias espécies de quelônios.

No entanto, Ceriani & Wyneken (2008), utilizaram técnica histológica em três espécies de tartarugas marinhas (*Demorchelys coreacea*, *Chelonia mydas* e *Carreta carreta*) obtendo um nível de acerto de 80% na sexagem. Os autores concluíram que os caracteres morfológicos podem variar dependendo da espécie a ser estudada. Isso significa dizer que a presença ou ausência de uma característica morfológica que ajuda a identificar o sexo numa dada espécie não pode ser generalizada para o grupo.

Portanto, nos quelônios, ainda há controvérsias sobre quais são os métodos mais eficientes para a identificação do sexo em filhotes. Levando em consideração a importância da técnica histológica na sexagem de quelônios e os poucos trabalhos direcionados para esta técnica, é proposto neste estudo caracterizar a morfologia das gônadas em recém-eclodidos da espécie *Eretmochelys imbricata* e verificar se existem diferenças entre as gônadas de machos e fêmeas, em seus aspectos macro, microscópico e ultraestrutural.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar sexualmente filhotes natimortos de tartaruga-de-pente (*Eretmochelys imbricata*) por meio de técnicas morfológicas das gônadas e anexos.

### 2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1- Descrever macroscopicamente as gônadas de filhotes natimortos da de *E. imbricata*;

2.2.2 Mensurar a largura das gônadas de filhotes natimortos da de *E. imbricata*;

2.2.3- Diferenciar microscopicamente as gônadas e ductos paramesonéfricos de filhotes natimortos de *E. imbricata*;

2.2.4 Descrever a ultraestrutura das gônadas de filhotes natimortos da de *E. imbricata*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1- TARTARUGAS MARINHAS

As tartarugas marinhas são animais pertencentes à classe *Reptilia*, ordem *Testudines*, subordem *Cryptodira*, pertencente a duas famílias: Cheloniidae e Dermochelyidae. A família Cheloniidae inclui seis espécies de tartarugas marinhas, com carapaça coberta por placas. A família Dermochelyidae inclui somente a tartaruga de couro que, em vez de uma carapaça coberta por placas, possui pele semelhante a couro (LIMPUS, 1993).

Acerca das espécies encontradas mundialmente, podemos dizer que existe sete espécies, sendo que cinco delas habitam o litoral brasileiro: *Caretta caretta*, ou mais conhecida por tartaruga cabeçuda; *Lepidochelys olivácea*, ou tartaruga-oliva; *Chelonia mydas*, ou tartaruga-verde; *Dermochelys coriácea*, ou tartaruga-de-couro; *Eretmochelys imbricata*, ou tartaruga-de-pente (MARCOVALDI ET al., 2011).

São animais considerados pulmonados, dispendo de grande capacidade respiratória embaixo da água. Essa capacidade deve-se à distribuição do oxigênio pelo corpo do animal de forma eficiente, associado ao baixo índice metabólico, permitindo a troca gasosa em órgãos específicos como a cloaca e a faringe (LUTCAVAGE & LUTZ, 1997).

A visão, olfato e a audição desses animais são bem desenvolvidos, devido a sua boa capacidade de orientação. E sobre esse assunto, existem várias discussões acerca das migrações bem orientadas, em especial da capacidade das fêmeas, de regressar ao local de nascimento para realizarem suas desovas (CARRERAS et al., 2018).

Esses répteis possuem distribuição de habitats nos mares tropicais e subtropicais do planeta (SANTOS, 2013). Cada população de tartaruga possui diferentes tipos de agrupamentos, sendo que, na maioria das vezes a interação entre as mesmas ocorre de forma aleatória, somente devido a alimentação (FARIAS, 2014).

##### 3.1.1- *Eretmochelys imbricata*

No Brasil, essa espécie é conhecida como tartaruga-de-pente, ou tartaruga legítima (Figura 1). Possui distribuição nos mares tropicais e raramente, em mares subtropicais. Seu habitat preferido são os recifes e águas mais rasas da costa (MORTIMER, 1999).

**Figura 1:** *Eretmochelys imbricata* adulta após a desova na praia de cabo de São Roque, RN.



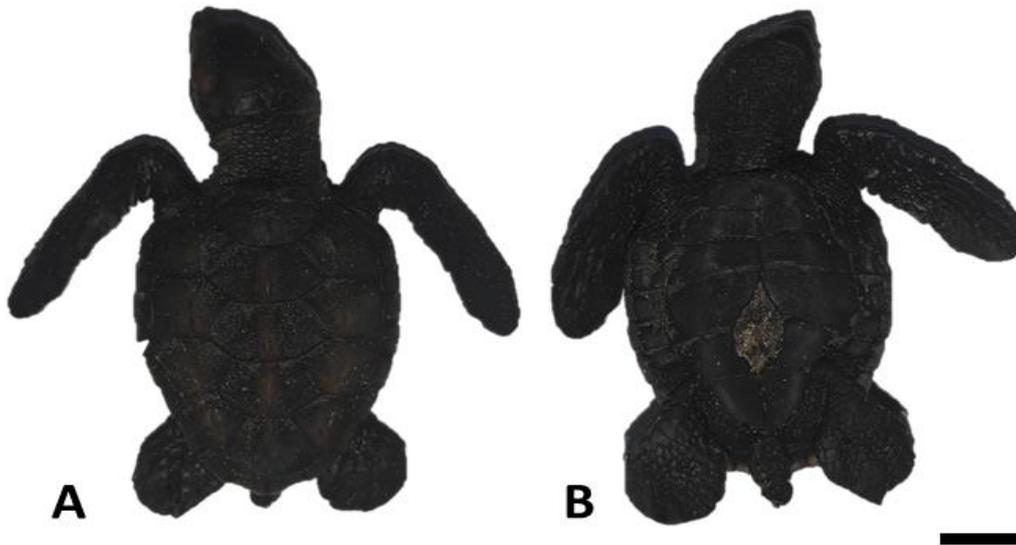
**Fonte:** arquivo pessoal

A carapaça dessa espécie possui 04 pares de placas laterais, sobrepostas como telhas de coloração marrom e amarelo. Já o plastrão possui coloração amarelo-claro. Sua cabeça é pequena e arredondada, possui bico semelhante ao de um falcão, com dois pares de placas pré-frontais e três pares pós-orbitais e suas nadadeiras possuem duas garras (MARQUEZ, 1990).

Em geral, essa espécie possui um crescimento e maturação relativamente lento quando atingem a fase adulta (CARRERAS et al., 2018). Sendo que seu tamanho na fase adulta costuma variar entre 80 a 95 centímetros de comprimento da carapaça (HESNI et al., 2016) e seu peso, em média, varia entre 80 a 95 quilogramas quando adultos (HESNI et al., 2016).

O filhote (Figura 2) migra para a plataforma continental até atingir a parte oceânica, a onde irá habitar e se alimentar até tornar-se juvenil. Nessa fase da vida são oportunistas, no que diz respeito à sua dieta, onde entram em fase bentônica, alimentando-se e refugiando-se até atingirem sua maturidade sexual (BOLTOTEN, 2003).

**Figura 2:** Filhote natimorto de *Eretmochelys imbricata*. **A** (vista dorsal), **B** (vista ventral). Escala: 1cm



**Fonte:** Acervo do autor

Os indivíduos adultos que passaram pelo período de desova, costumam adentrar em uma fase pelágica, ou seja, esses animais permanecem longe do fundo, nas colunas de água, até atingirem cerca de 20 cm de comprimento de carapaça, onde orientam-se e nadam até encontrarem uma praia para nidificação (MARCO et al., 2018).

As áreas de desova dessa espécie no Brasil são no norte da Bahia, em Sergipe e no litoral sul do Rio Grande do Norte. O período de desova na Bahia e Sergipe geralmente ocorre no início de novembro até março, sendo os meses de maior desova: dezembro, janeiro e fevereiro. Já no Rio Grande do Norte, a desova ocorre principalmente de novembro a abril, tendo como os meses de maior desova: janeiro, fevereiro e março (MARCOVALDI et al, 2007).

## **3.2- MORFOFISIOLOGIA DO APARELHO UROGENITAL**

### **3.2.1 FASE JUVENIL**

O desenvolvimento dos órgãos do aparelho urogenital dos indivíduos juvenis do início nas cristas genitais que se desenvolvem a partir de um espessamento do

mesotélio, localizados na posição ventromedial do mesonefro, anexados dorsolateralmente na parede da cavidade celomática, ventral aos pulmões, constituindo uma estrutura alargada e esbranquiçada, sendo impossível distinção a olho nu em ovário ou testículo (ROSA 2005). A formação da gônada é em pares, inicialmente como um órgão indiferenciado, bipotencial, com destino para testículo ou ovário a depender das influências de temperatura e dos efeitos hormonais (PILCHER, 1999).

Com relação a macroscopia, a gônada apresenta forma delgada, alongada e com as extremidades mais afiladas, ocupando quase que toda a margem ventromedial do mesonefro. Entre os sexos, a gônada do macho apresenta maior espessura, sendo ligeiramente menor que o ovário (MALVASIO et al., 2002). Há relatos de que a avaliação morfológica das gônadas em estereomicroscópio seria suficiente para identificar o sexo dos filhotes recém eclodidos para quelônios (MALVASIO et al., 2011).

Durante o desenvolvimento gonadal, a gônada apresenta dois compartimentos distintos, sendo uma medula interna e uma cortical externa, envoltas em uma camada de células de revestimento. Estas estruturas celulares sofrem modificações durante a gonadogênese. Esta, por sua vez, pode ser descrita em três fases, sendo elas: a formação da crista genital, desenvolvimento da gônada morfológicamente indiferenciada e o estágio final da diferenciação gonadal (RAMSEY; CREWS, 2009). Vale salientar que na gônada bipotencial, na região cortical, encontram-se predominantemente as células germinativas primordiais (CGP) e na região medular, os cordões sexuais primitivos (RAMSEY; CREWS, 2009).

No embrião masculino, os túbulos seminíferos se desenvolvem a partir dos cordões sexuais presentes na gônada primordial. Já em embriões femininos, as células somáticas do epitélio cortical e as células germinativas proliferaram para formar os folículos ovarianos primordiais (GILBERT et al., 2003). Estas mudanças acentuam-se com o avançar dos dias do período de incubação, principalmente durante o período termosensível (MORENO-MENDOZA et al., 2001).

Durante a formação do testículo, o epitélio gonadal se achata e as células germinativas desprendem-se para migrar para os cordões sexuais na região medular. Estes cordões medulares formam o primórdio dos 10 cordões seminíferos presuntivos (com contorno arredondado delimitado por uma membrana basal), como relatado por Pieau et al. (1999). Após a TSP, nos machos, uma fina túnica albugínea envolve as gônadas composta por fibroblastos, assim como é possível observar células intersticiais entre os túbulos (OTSUKA, 2008).

No embrião feminino, os ovários, o epitélio germinativo se espessa devido à proliferação das células epiteliais cuboides e células germinativas, o primórdio dos futuros folículos ovarianos (PIEAU et al., 1999; GILBERT, 2003; MOORE; PERSAUD, 2008). O córtex continua seu espessamento devido às numerosas meioses das células germinativas, que logo mais darão origem aos primeiros folículos primordiais em crescimento nesta região (PIEAU et al., 1999).

Já na fase da pré puberdade as fêmeas apresentam ovários com pequenos folículos pré vitelogênicos no estroma compacto. Durante a puberdade o estroma do ovário se torna parcialmente expandido, os folículos pré vitelogênicos apresentam tamanho uniforme e podem ocorrer folículos atrésicos (PÉREZ-BERMUDEZ et al., 2012). No entanto, a presença de folículos vitelogênicos amarelos e vascularizados, com mais de três milímetros, indicativos de ovulação, e a presença de ovos no oviduto são características fenotípicas usadas para determinar a maturidade sexual (HAMANN et al., 2003).

Nos machos, a fase da pré-puberdade é marcada pela presença de túbulos minúsculos nos testículos. Sendo que na puberdade ocorre o aumento de tamanho e variação da forma dos testículos, tornando elipsoidal (OTSUKA, 2008). Além disso, na puberdade, os níveis de testosterona tendem a aumentar, no qual esse esteroide irá estimular aparecimento de características sexuais secundárias, a maturação dos túbulos seminíferos e o início da espermatogênese na fase adulta (WIBBELS et al., 1991).

### **3.2.2 FASE ADULTA**

Com relação ao aparelho urogenital das tartarugas adultas, o mesmo é formado pelos rins, ureteres, gônadas e seus ductos, bexiga urinária e estruturas derivadas da papila genital (pênis e clitóris), presentes no interior da cloaca. Os rins atuam na remoção dos resíduos nitrogenados da circulação sistêmica (excreção) e na osmoregulação. A bexiga urinária armazena água e urina. Os ureteres transportam os resíduos removidos pelos rins até a cloaca, onde são drenados para a bexiga urinária ou são eliminados. Já as gônadas produzem os gametas e seus ductos transportam os ovos ou sêmen até a cloaca. A cloaca se comunica com o exterior através da abertura localizada na porção distal (WYNEKEN, 2001).

As fêmeas possuem um par de ovários, ovidutos e ligamentos suspensórios (mesovário, mesosalpinge e mesotubário). Os ovários apresentam-se estruturalmente alongados, estendendo-se da região anterior para a posterior-medial na face ventral dos rins, com oviduto seguindo lateralmente o ovário (MALVASIO et al., 2011). O ovário e

o oviduto variam de tamanho e morfologia de acordo com a idade e os intervalos entre as temporadas reprodutivas (HAMANN et al., 2003). Este oviduto é circundado por tecido conjuntivo frouxo, onde este tecido projeta-se apicalmente, formando um apêndice de comprimento proporcional ao diâmetro do oviduto (MALVASIO et al., 2011).

Nas fêmeas, os folículos presentes nos ovários aumentam de tamanho e adquirem uma coloração amarelada brilhante quando estão sexualmente maduras. Os folículos maiores alongam-se em sentido cranial, ao passo que os menores e imaturos permanecem mais concentrados no terço posterior do ovário. Normalmente entre as espécies de tartarugas os folículos são considerados maduros ao apresentarem 2-3cm de diâmetro, ocorrendo no momento oportuno às ovulações e acasalamento das fêmeas (WYNEKEN, 2001).

Assim como os ovários, os ovidutos também passam pelo processo de maturação. Esse processo fica evidente ao compararmos a mudança na estrutura de simples paredes tubulares delgadas, para paredes musculares espessas e móveis com aumento linear do diâmetro luminal. O oviduto aparece dobrado ao longo de todo seu comprimento quando não está ativo. É funcionalmente dividido em cinco regiões: óstio ou infundíbulo, segmento aglandular, magno, concha glandular e vagina (WYNEKEN, 2001).

Na época reprodutiva, um grupo inteiro de folículos maduros ovula junto, e os oócitos são captados pelo oviduto, na região do infundíbulo. Uma vez no oviduto, cada folículo passa posteriormente pelo segmento aglandular e adentra no magno, onde é recoberto por uma camada de albumina. Após três dias, os folículos passam para a região da concha glandular, onde são secretados proteínas e carboidratos de membrana (cório) e passam a ser chamados de ovos (HAMANN et al., 2003). Nessa região, onde permanecem aproximadamente por sete dias, os ovos adquirem deposição de cálcio (calcificação), sendo na sequência depositados na vagina, onde podem permanecer durante vários dias, até que passem pela cloaca e sejam desovados (ovoposição) (WYNEKEN, 2001).

Os machos por sua vez possuem um par de testículos, ductos deferentes, epidídimos, ligamentos suspensórios e um pênis (MALVASIO et al., 2011). Os ductos paramesonéfricos podem persistir em alguns machos como um par de tubos, lisos e pequenos, com as paredes bem finas, localizados ao longo da parede corporal, sendo suspensos por um mesotubo, desde o ducto dos testículos ou peritônio (DELGADO, 2008).

Os testículos apresentam forma fusiforme, localizados junto ao hilo renal (MALVASIO et al., 2011), e, dependendo da espécie, possui cor amarela brilhante ou cinza rosada, estando o mesmo ligado ao peritônio pelo mesórquio (LUTZ et al., 2003). Os espermatozoides são produzidos por células testiculares especializadas e carreados por pequenos ductos eferentes até o epidídimo, posicionado lateral ou posterolateralmente aos testículos. Dos epidídimos, local em que ocorre a maturação espermática, os espermatozoides seguem pelos ductos deferentes até a cloaca, mais precisamente no sulco espermático na base do pênis (WYNEKEN, 2001).

O pênis é retrátil e localiza-se caudalmente a cloaca. É composto por um par de corpos cavernosos associados a um sulco espermático. Durante a cópula, os corpos cavernosos são preenchidos por sangue e o sulco espermático se contrai, adquirindo forma tubular, facilitando a passagem do sêmen e fluidos (WYNEKEN, 2001).

### **3.3- INFLUÊNCIA DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS NA REPRODUÇÃO**

As tartarugas marinhas, e a maioria dos seres vivos presentes no ambiente marinho, estão sujeitas as alterações no meio resultante de fenômenos climatológicos globais e ações antrópicas que podem influenciar as variações de temperatura no ecossistema aquático (LOPEZ et al. 2015; PHAM et al., 2017; SWIGS et al., 2018).

Essas alterações nas condições edafoclimáticas, promovem influências que afetam o sexo dos embriões, a emergência dos ninhos, o crescimento e a sobrevivência dos filhotes, sendo inquestionável a interferência da temperatura na vida e reprodução das tartarugas marinhas (FUENTES et al. 2011; 2013; LALOË et al. 2017).

A temperatura do ambiente em especial é um fator de grande influência não apenas na sobrevivência dos filhotes, mas exerce um papel determinante na razão sexual das ninhadas de tartarugas marinhas (MROSOVSKY, 1994; KOBAYASHI et al. 2017; LALOË et al. 2017). Temperaturas abaixo de 29°C favorecem filhotes machos; acima de 28 °C favorecem filhotes do sexo feminino; e a temperatura de 28 e 30 °C favorece igualmente ambos os sexos (FERREIRA JÚNIOR, 2009). Além disso, o tempo de incubação aumenta em temperaturas mais baixas, sendo que a redução de 1 °C na incubação dos ovos pode aumentar em cinco dias o período de incubação (SIMÕES et al. 2014).

Vale salientar que as tartarugas marinhas respondem às alterações climáticas como fizeram no passado, mudando a distribuição das áreas de desovas, associado a mudança das rotas migratórias, desovando em período mais frios. Essas mudanças

ocorrerão principalmente em tartarugas juvenis, que somará ao *pool* reprodutivo nas próximas gerações. O preocupante é que as mudanças climáticas ocorrerão em uma velocidade muito superior a capacidade de adaptação das tartarugas marinhas (SANTOS, 2009).

Atrelado a isso vem a necessidade da caracterização do aparelho urogenital pós-eclosão, pois esses órgãos ainda estão em processo de desenvolvimento e maturação e essas mudanças climáticas podem alterá-los. Para isso é importante conhecer a morfologia nesse estágio e apontar alternativas para amenizar esses efeitos.

### **3.4- MÉTODOS DE SEXAGEM COMO FERRAMENTA EM ESTUDO COM TARTARUGAS MARINHAS**

As tartarugas marinhas, assim como a maioria dos quelônios, possuem determinação sexual dependente da temperatura (*Temperature-Dependent Sex Determination-TDS*) na qual os ovos são incubados (KAWAGOSHI et al., 2012) ou na sua minoria através do genótipo (*Genotypic Sex Determination- GSD*), com os machos carregando cromossomos heteromórficos (XY/XX) e a fêmea (ZZ/ZY) (KAWAGOSHI et al., 2012).

As porções do ninho com temperaturas mais elevadas favorecem o nascimento de fêmeas, enquanto temperaturas mais baixas o nascimento de machos. Entretanto, a determinação só ocorre no segundo terço da incubação, quando a temperatura influencia a atuação de enzimas envolvidas na diferenciação gonadal (SÁNCHEZ-OSPINA et al., 2009; PINTO et al., 2015).

Estudos relacionados à proporção sexual têm sido de grande interesse em razão da preocupação dos possíveis efeitos que podem ocorrer devido às mudanças climáticas globais, os quais favorecem a feminilização da população nos cenários extremos previstos no Painel Intergovernamental para Mudanças Climáticas (WIBBELS et al., 1991; KAMEL e MROSOVSKY, 2006). Entretanto, em recém-eclodidos e jovens o sexo não pode ser identificado com precisão; por isso, existem algumas metodologias para identificação sexual em tartarugas, no qual a escolha do processo de sexagem está relacionada à faixa etária do animal (MALVASIO et al., 2002; CASALE et al., 2006).

Alguns métodos de identificação sexual em filhotes foram desenvolvidos devido à necessidade em se conhecer o sexo de grandes números de animais (MERCHANT-LARIOS, 1989). Porém, há grandes dificuldades na identificação sexual dos filhotes em razão dos métodos usados na sexagem serem complexos (VALENZUELA et al., 2004).

A metodologia mais utilizada na sexagem de neonatos é a análise visual da anatomia das gônadas, levando em consideração características morfológicas distintas, tais como a cor, o tamanho, a vascularização e textura da gônada, bem como o tamanho e espessura do oviduto/ducto Mulleriano (MALVASIO et al., 2011). Ceriani e Wyneken (2008), utilizaram esta técnica em três espécies de tartarugas marinhas (*Demorhelys coreacea*, *Chelonia mydas* e *Carreta carreta*) obtendo um nível de acerto de 80%. No qual os autores concluíram que os caracteres morfológicos citados acima podem variar dependendo da espécie a ser estudada. Isso significa dizer que a presença ou ausência de uma característica morfológica que ajuda a identificar o sexo numa dada espécie não pode ser generalizada para o grupo. Além de que, muitas vezes, o grau de acerto está relacionado à experiência do examinador (SOUZA e VOGT, 1994).

Nesse sentido, para se ter um método confiável, faz-se necessário o estabelecimento de critérios espécie-específicos, além de uma análise simultânea macro e microscópica das gônadas. Considerando isso, YNTEMA e MROSOVSKY (1980) concluem ser necessária uma avaliação histológica para uma identificação sexual. Além disso, todos os demais métodos de sexagem precisam ser validados por meio de uma detalhada análise histológica das gônadas (MERCHANT-LARIOS, 1989; XIA et al., 2011; MALVASIO et al., 2012).

De fato, a forma mais segura e definitiva de determinar o sexo de filhotes de tartarugas marinhas é através da dissecação e avaliação histológica das gônadas (GODFREY et al., 1997; WIBBELS, 1991; BONACH et al., 2011). Para isso, é necessário a observação das características microscópicas peculiares para identificar o sexo, tais como a presença do epitélio germinativo nas gônadas femininas (ovários) e a formação de cordões testiculares nas gônadas masculinas, testículos (CERIANI & WYNEKEN, 2008).

Nas tartarugas fêmeas jovens, o epitélio germinativo é constituído pelas oogônias ou ovócitos primordiais e células foliculares, enquanto o estroma medular é formado pelo interstício e rico em vasos (YAZAWA et al., 2015). Por outro lado, os testículos dos jovens ainda não possuem região luminal e são considerados como cordões seminíferos formados pelas células de Sertoli e gonócitos (MERCHANT-LARIOS, 1989). As células de Sertoli sintetizam o hormônio antimülleriano que inibe o desenvolvimento do ducto mülleriano e evita a formação do oviduto. Já os gonócitos diferenciam-se em espermatogônias para formar futuramente os espermatozoides (HUTSON et al., 2012).

No entanto, temperaturas mais altas causam um aumento exponencial de atividade de aromatase, aumentando exponencialmente na diferenciação dos ovários, por outro lado, em temperaturas mais baixas a atividade da aromatase permanece baixa, diminuindo a diferenciação dos testículos (PIEAU, 1996; MAGALHÃES, 2017).

Isso se deve ao fato de que a aromatase é a enzima que catalisa irreversivelmente os andrógenos em estrogénos e, portanto, desempenha um papel central no equilíbrio da produção de hormônios esteroides (MATSUMOTO et al., 2012). Uma vez que a diferenciação tenha terminado e o destino da gônada estabelecido, mudanças adicionais na temperatura parecem não ter nenhum efeito (MANOLAKOU et al., 2006).

Os métodos morfométricos são utilizados para descrever e comparar formas tanto de organismos quanto de estruturas, que podem representar diferentes localidades ou estágios de desenvolvimento (ROHLF & MARCUS, 1993). Uma fonte de dados bastante rica em informações para a morfometria geométrica são os marcos anatômicos. Esses são coordenadas as quais estão ligadas a processos biológicos e devem ser bem selecionados antes das análises (MONTEIRO & REIS, 1999).

A utilização da morfometria geométrica para sexagem em filhotes de testudines se mostrou bem significativa em espécimes de *Podocnemis expansa* (VELENZUELA et al., 2004), *Trachemys scripta* (MYERS et al., 2006), *Chelonia mydas* (DOMINGUES, 2018) e *Caretta caretta* (FERREIRA-JUNIOR et al., 2011; MENDES, 2016).

### **3.5- ASSOCIAÇÃO DE PROTEÇÃO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL CABO DE SÃO ROQUE**

Desde 2016, no estado do Rio Grande do Norte, a Associação de Proteção e Conservação Ambiental (APC) Cabo de São Roque no município de Maxaranguape - RN desenvolve atividades em prol da conservação das tartarugas marinhas. Junto com a comunidade ações para a defesa e proteção das tartarugas marinhas e do ambiente costeiro da região são realizadas

No município de Maxaranguape, antes da APC Cabo de São Roque, a caça das tartarugas marinhas e a coleta dos ovos eram atividades que faziam parte do dia a dia da comunidade local. Além do consumo da carne, eles também comercializavam acessórios confeccionados a partir do casco das tartarugas marinhas como pentes e objetos para decoração. Diante disso, a APC Cabo de São Roque passou a desenvolver projetos no intuito de estimular a comunidade a participar ativamente do processo de conservação local, por meio de ações do projeto “Sensibilização e Educação Ambiental”, como

Cinema itinerante, Museu itinerante, palestras nas escolas, limpeza de praias e oficinas de capacitação para identificação e manejo de tartarugas presas em rede com os pescadores que participam do “Projeto Pescador Amigo da Conservação”.

Essas atividades além de contribuírem para o processo de multiplicação de conhecimento na comunidade, também é um papel importante na sensibilização de turistas que visitam diariamente a região. Os resultados desse trabalho estimulam a pesca sustentável, o turismo ecológico e a valorização da cultura e economia local.

Principalmente na estação reprodutiva, os pescadores, crianças, jovens e mulheres auxiliam na realização de campanhas para a não poluição das praias, bem como no monitoramento de veículos nas áreas dos ninhos e notificação de encalhe de tartarugas. Essas atividades não apenas reduzem os impactos ambientais nas praias de Maxaranguape como também ajudam na proteção das tartarugas.

**Figura 3-** Atividades desenvolvidas pela Associação de Proteção e Conservação Ambiental Cabo de São Roque, Maxaranguape-RN.



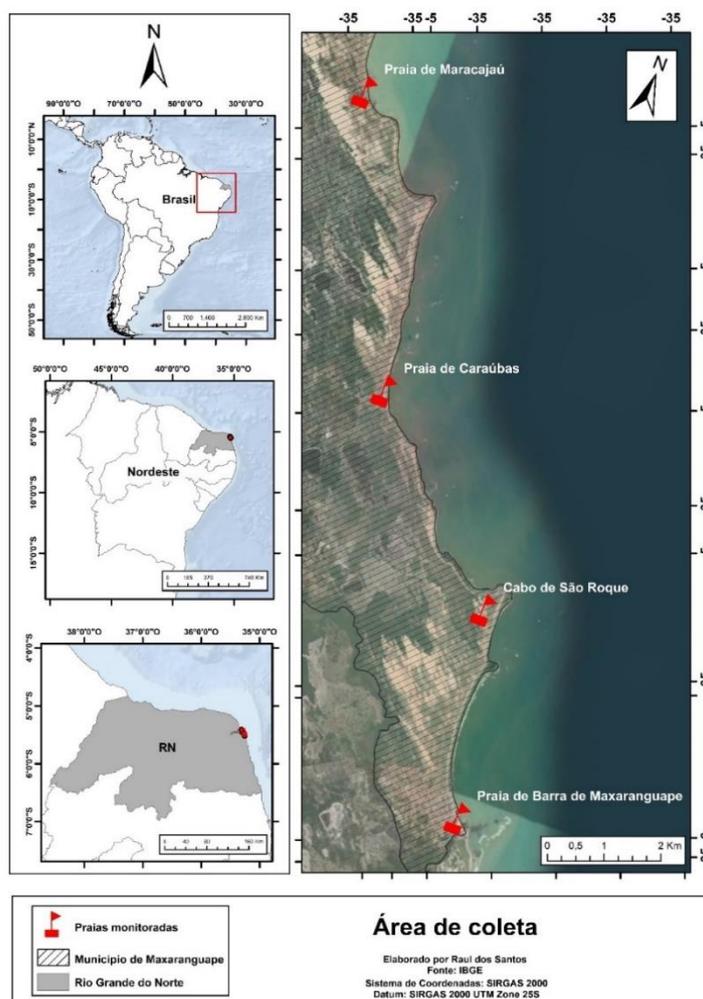
**Fonte:** Acervo APC Cabo de São Roque, 2019

## 4- MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DE COLETA

O estudo foi realizado no município de Maxaranguape localizado na microrregião do leste nordeste do estado do Rio Grande do Norte, pertencente à mesorregião do leste potiguar. A região possui 4 praias arenosas compreendendo uma área de 21 km de linha de costa: Barra de Maxaranguape, Cabo de São Roque, Caraúbas e Maracajaú. Os animais foram coletados em janeiro de 2020 durante a temporada reprodutiva da espécie, precisamente na praia Cabo de São Roque (Figura 4) (Latitude:  $5^{\circ} 30' 9''$ ;  $59^{\circ} 39' 39''$ ; Sul, Longitude:  $35^{\circ} 15' 39''$ ;  $45^{\circ} 39' 39''$  Oeste), área de maior incidência de atividade reprodutiva de tartarugas de pente no município do Rio Grande do Norte.

**Figura 4:** Mapa da região de coleta na praia de Caraúbas, no município de Maxaranguape, RN (APCA – Cabo de São Roque).



**Fonte:** Raul dos Santos.

## 4.2 – ANIMAIS

As informações utilizadas no processo de coleta foram obtidas da base de dados gerado pela Associação de Proteção e Conservação Ambiental Cabo de São Roque (APC Cabo de São Roque), cuja base de dados é padronizada seguindo os protocolos exigidos pelos entes nacionais que regulamentam esse tipo de atividades (TAMAR/ICMBio/MMA - Licença SISBIO n° 64308-2). As variáveis analisadas incluíram os seguintes parâmetros do ninho: quantidade de filhotes (vivos e natimortos), quantidade de ovos (não eclodidos e não viáveis), duração da incubação e sucesso reprodutivo. Dos ninhos foram coletados 30 natimortos (Figura 5).

**Figura 5:** Abertura de ninho e coleta dos natimortos de *Eretmochelys Imbricata* em Cabo de São Roque (RN).

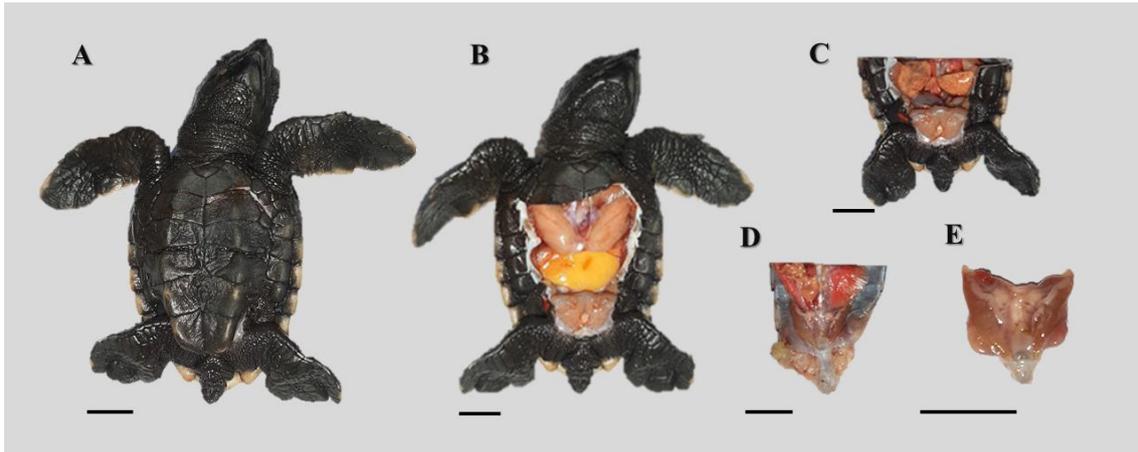


**Fonte:** Arquivo Pessoal.

Após a coleta, o acesso a cavidade celomática dos natimortos foi realizado por meio de uma incisão no plastrão (Figura 6-ABC). Após a abertura do plastrão foi possível a identificação e dissecação do complexo gônada-mesonefro (CGM) (Figura 6-DE). Após a dissecação o CGM foi dividido em antímeros, sendo um fixado em paraformaldeído a 4% e o outro em glutaraldeído a 2,5% ambos em tampão fosfato pH 7,2. Para a documentação fotográfica macroscópica foi utilizada câmera digital Canon ESO1000T3 acoplada ao

estereoscópio Labomed Luxeo 4D Digital Stereozoom. As imagens foram editadas e formatadas usando o programa Photoscape versão 3.7 (Figura 6).

**Figura 6:** Complexo gônada-mesonefro de filhotes natimortos de *Eretmochelys imbricata*. **A:** Vista ventral; **B:** Abertura da cavidade celomática; **C:** Corte transversal do indivíduo; **D:** Exposição do aparelho urogenital; **E:** Complexo gônada-mesonefro (CGM) dissecado. Escala : 1cm.



**Fonte:** Acervo do autor

### 4.3 - MACROSCOPIA DO COMPLEXO GÔNADA-MESONEFRO (CGM)

Após a retirada do plastrão e visualização do CGM, foi observada características macroscópicas como: forma, aspecto, topografia, cor da gônada e forma das extremidades. Também foi realizada a morfometria da gônada e do mesonefro.

#### 4.3.1 Mensuração da largura maior da gônada e do mesonefro

A largura da gônada e do mesonefro foram obtidas a partir de fotomicrografias realizadas após abertura do plastrão, com auxílio de câmera digital Canon SX270. As medidas foram realizadas utilizando software Image Proplus® versão 4.5. Todas as imagens foram calibradas no programa de acordo com escala utilizada na captura das imagens, sendo sempre mensurada a maior largura das gônadas e mesonefros de cada animal.

### 4.4 - MICROSCOPIA DO COMPLEXO GÔNADA-MESONEFRO (CGM)

#### 4.4.1- Microscopia de luz

O processamento histológico foi realizado no Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (UFERSA). As amostras foram submetidas a processamento histológico seguindo o seguinte protocolo: desidratação em série gradual de etanol (80%, 90%, 95% por 15 minutos cada e 100% (2x) por 10 min cada), diafanizados em 2 ou 3 banhos de Xilol por 5 min cada, e incluídos em 2 parafinas, sendo 45, com posterior emblocagem (Magalhães, 2017). Posteriormente foram feitos cortes seriados em 4 $\mu$ m e as lâminas preparadas submetidas à técnica de coloração por Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas foram observadas e imagens obtidas em microscópio Labomed Luxeo 4D Digital Stereozoom.

#### **4.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

As análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas no Laboratório Temático de Microscopia Ótica e Eletrônica do INPA. As amostras foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 100 mM, pH 7,2 (3 x por 10 minutos cada). Em seguida, realizou-se 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. Foram realizadas contração in bloco com acetato de uranila aquosa a 2%, overnight a 4 ° C, seguido por desidratação em séries de etanol graduado de 15%, 30%, 50%, 70%, 95%, 100% (2 x) durante 10 minutos e óxido de propileno (2 x) 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 72 h. 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 foram visualizadas sobre microscópio eletrônico de Transmissão 109 Zeiss EM operando em uma tensão de aceleração de 80 kV.

#### **4.5- ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As mensurações macroscópicas foram submetidas a análise de Mann-whitney U, com teste de Wilcoxon W a posteriori, considerando o intervalo de confiança de 95%, a fim de verificar alguma relação entre as larguras das gônadas e mesonefros e o identificação sexual.

## 5 – RESULTADOS

### 5.1- Macroscopia das gônadas

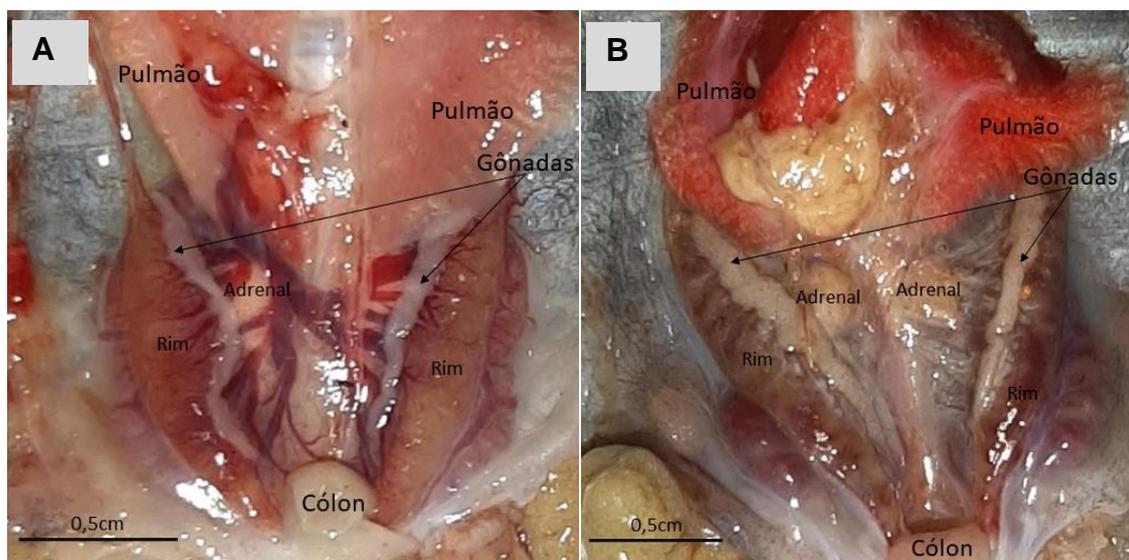
As gônadas dos natimortos são órgãos pares localizados dorsalmente na cavidade celomática, estendendo-se da região pélvica até os pulmões. Foi possível a visualização das glândulas adrenais, localizadas entre os mesonefros. As gônadas femininas possuíam um aspecto granuloso, como uma estrutura com coloração variando de esbranquiçada para translúcida e com forma fusiforme alongada acompanhando toda extensão do mesonefro. Também foi possível observar que a gônada das fêmeas é mais vascularizada do que as dos machos, além de possuírem vasos com uma maior dilatação (Figura 7A). Já os indivíduos sexados como machos, as gônadas foram identificadas com superfície lisa, com cor branco opaco e formato aproximadamente ovoide. Além disso, apresentavam-se aparentemente mais estreitas que os ovários e geralmente não aderida a toda extensão do mesonefro (Figura 7B).

### 5.2- Morfometria das gônadas e mesonefros

Os resultados da morfometria das gônadas e mesonefros dos filhotes de *E. imbricata* estão descritos na Tabela 1 e a comparação entre as medidas das gônadas e mesonefros de fêmeas e machos, para verificar a ocorrência de diferenças entre maior largura das gônadas direita e esquerda entre machos e fêmeas.

Através da resultados obtidos verificou-se que apesar de haver diferença entre as gônadas dos machos e fêmeas na observação macroscópica, a morfometria (largura) não foi significativa quando correlacionada entre os sexos e entre os antímeros (Tabela 1).

**Figura 7-** Macroscopia das gônadas de uma fêmea (A) e um macho (B) natimortos de *Eretmochelys imbricata*.



Fonte: Acervo do autor

**Tabela 1-** Largura média (média  $\pm$  desvio padrão) (Mann-whitney U, com teste de Wilcoxon W a posteriori, comparando a biometria das gônadas e mesonefros de natimortos machos e fêmeas de *Eretmochelys imbricata* com ( $p < 0,05$ )).

	Largura ( $\mu\text{m}$ )	
	Direito	Esquerdo
<b>Gônada</b>		
<i>Macho</i>	63,48 $\pm$ 17,66 <sup>n/s</sup>	61,11 $\pm$ 14,96 <sup>n/s</sup>
<i>Fêmea</i>	71,79 $\pm$ 17,67 <sup>n/s</sup>	66,86 $\pm$ 20,74 <sup>n/s</sup>
<b>Mesonefro</b>		
<i>Macho</i>	215,39 $\pm$ 42,64 <sup>n/s</sup>	187,93 $\pm$ 62,02 <sup>n/s</sup>
<i>Fêmea</i>	207,71 $\pm$ 36,43 <sup>n/s</sup>	201,81 $\pm$ 31,31 <sup>n/s</sup>

\*n/s não significativo ( $p < 0,05$ ).

### 5.3- Microscopia das gônadas

#### 5.3.1- Gônada

Ao analisar as gônadas, observou-se que no ovário a presença de córtex (C) bem desenvolvido, medula (M) densa, organização irregular e rica em tecido intersticial (Figura 8A, C). Nos machos, uma medula organizada com a presença de túbulos seminíferos e uma região cortical escassa ou inexistente (Figura 8B, C).

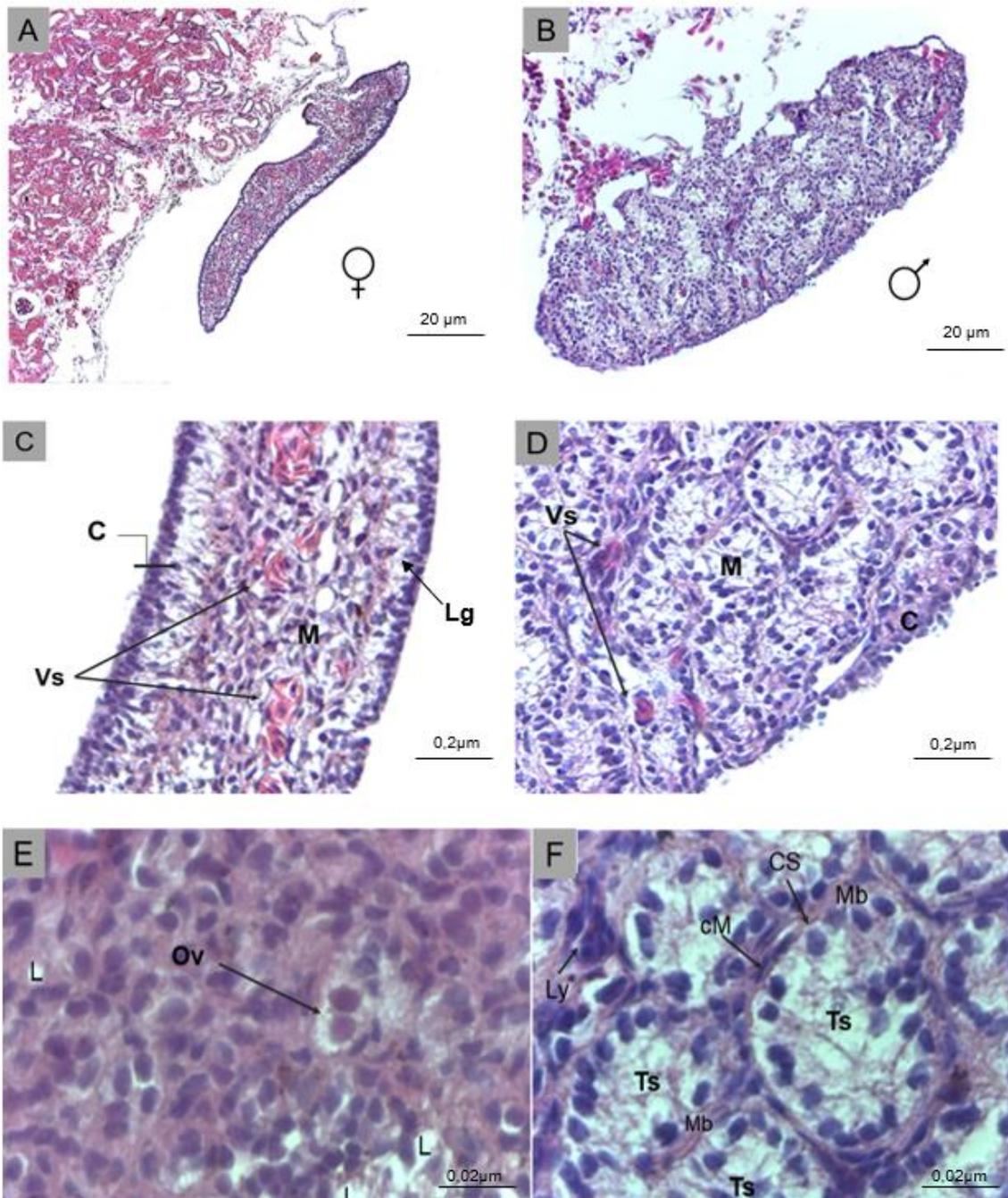
Relacionado as características microscópicas encontradas nas fêmeas, o córtex é recoberto por um epitélio cuboidal estratificado, que abriga células que compõe os leitos germinativos. Os leitos germinativos são cobertos por epitélio cuboidal, semelhante ao epitélio germinativo dos mamíferos, circundado internamente por tecido conjuntivo (Figura 8C). No córtex dos ovários, foram visualizadas estruturas semelhantes a folículos primordiais formados por única camada de células planas que envolviam uma célula de núcleo amplo, fracamente corado apresentando grânulos de cromatina dispersos no nucleoplasma, a qual foi identificada como ovogônia (Ov) (Figura 9C). O citoplasma da ovogônia (Ov) foi visto de forma reduzida, disforme e relativamente acidófilo. As estruturas foliculares que alojavam as ovogônias (Ov) estavam sustentadas por um tecido conjuntivo frouxo infiltrado por vasos sanguíneos (Vs) de pequeno calibre. A região medular é marcada pela presença de muitos vasos sanguíneos (Vs) e algumas lacunas (L). As lacunas (L) são heterogêneas em tamanho e seu conteúdo pode ser granuloso ou acidófilo e envolvidos por tecido conjuntivo frouxo (Figura 8 E).

Já nos cortes transversais de gônadas de macho, observou-se que são revestidos por uma camada de células planas, sustentadas por uma faixa fibrosa de tecido conjuntivo e com uma medula preenchida com túbulos seminíferos (Ts), estes possuindo na sua luz células esféricas, que foram identificadas como células espermatogênicas e também raras células, com citoplasma ramificado, com núcleo claro e ovoide, apresentando um nucléolo bem visível e citoplasma disperso, reconhecidas como as células de Sertoli (CS) (Figura 8D).

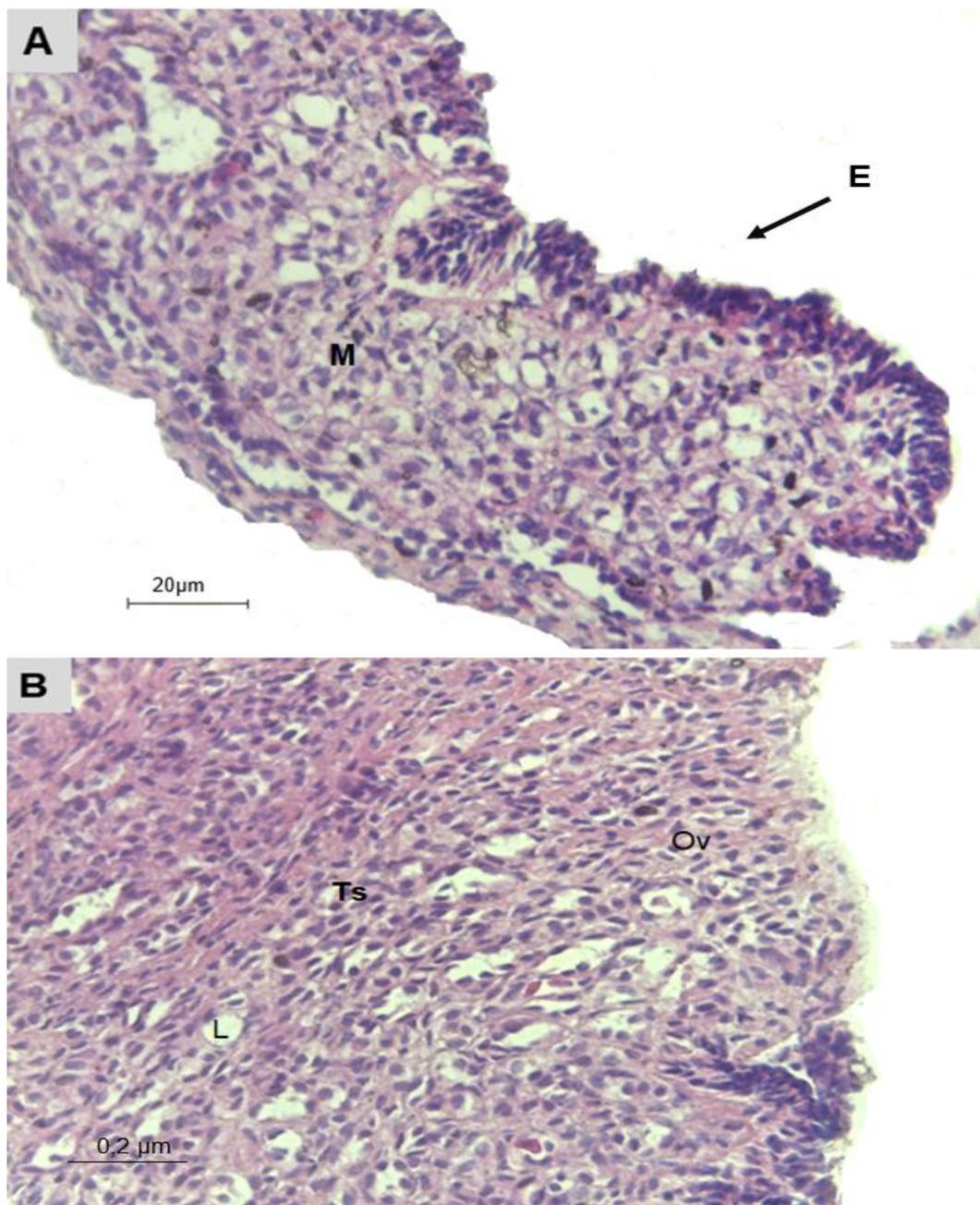
Os túbulos estavam circundados por células fusiformes semelhantes às células mioepiteliais (Cm) e ligados uns aos outros em uma bainha de tecido conjuntivo, a membrana basal (Mb). No interstício (I), entre as fibras de tecido conjuntivo, foram visualizadas algumas células poliédricas, com núcleo grande, arredondado e central, identificadas como células de Leydig (Ly) e vasos sanguíneos (Vs) (Figura 8D).

Vale ressaltar que pode ocorrer o desenvolvimento anormal da gônada (casos de intersexo), ou seja, características dos dois sexos (Figura 3). Nesses casos não é possível visualizar um padrão celular tanto na região cortical, como na medular. Nessa condição, observa-se estruturas que parecem com ovogônias (Ov) e canais semelhantes a túbulos seminíferos (Ts) na medula e uma variação no epitélio germinativo, regiões com epitélio estratificado e outras com camada celular simples (Figura 9).

**Figura 8-** Fotomicrografia de gônadas de natimortos de *Eretmochelys imbricata* **A-** Gônada de uma fêmea. **B** – Gônada de um macho. **C** – Gônada de uma fêmea em maior aumento. **D** - Gônada de um macho em maior aumento. **E** – Gônada de fêmea em maior aumento. **F** – Gônada de macho em maior aumento. **C** (Córtex); **M** (Medula); **Lg** (Leito germinativo); **Vs** (Vasos Sanguíneos); **Ov** (Ovogônia); **L** (Lacunas); **Ts** (Túbulos Seminíferos); **CS** (Células de Sertoli); **cM** (Células Mioepiteliais); **Ly** (Células de Leydig; **I** (Interstício); **Mb** (Membrana Basal), Hematoxilina e eosina.



**Figura 9-** Fotomicrografia das gônadas de filhotes natimortos de *Eretmochelys imbricata* apresentando intersexo. A – Gônada de filhote intersexo. B- Gônada de de filhote intersexo em maior aumento. **E:** epitélio; **M:** Medula; **Ts:** Túbulo seminífero; **L** lacuna; **Ov:** Ovogônia.

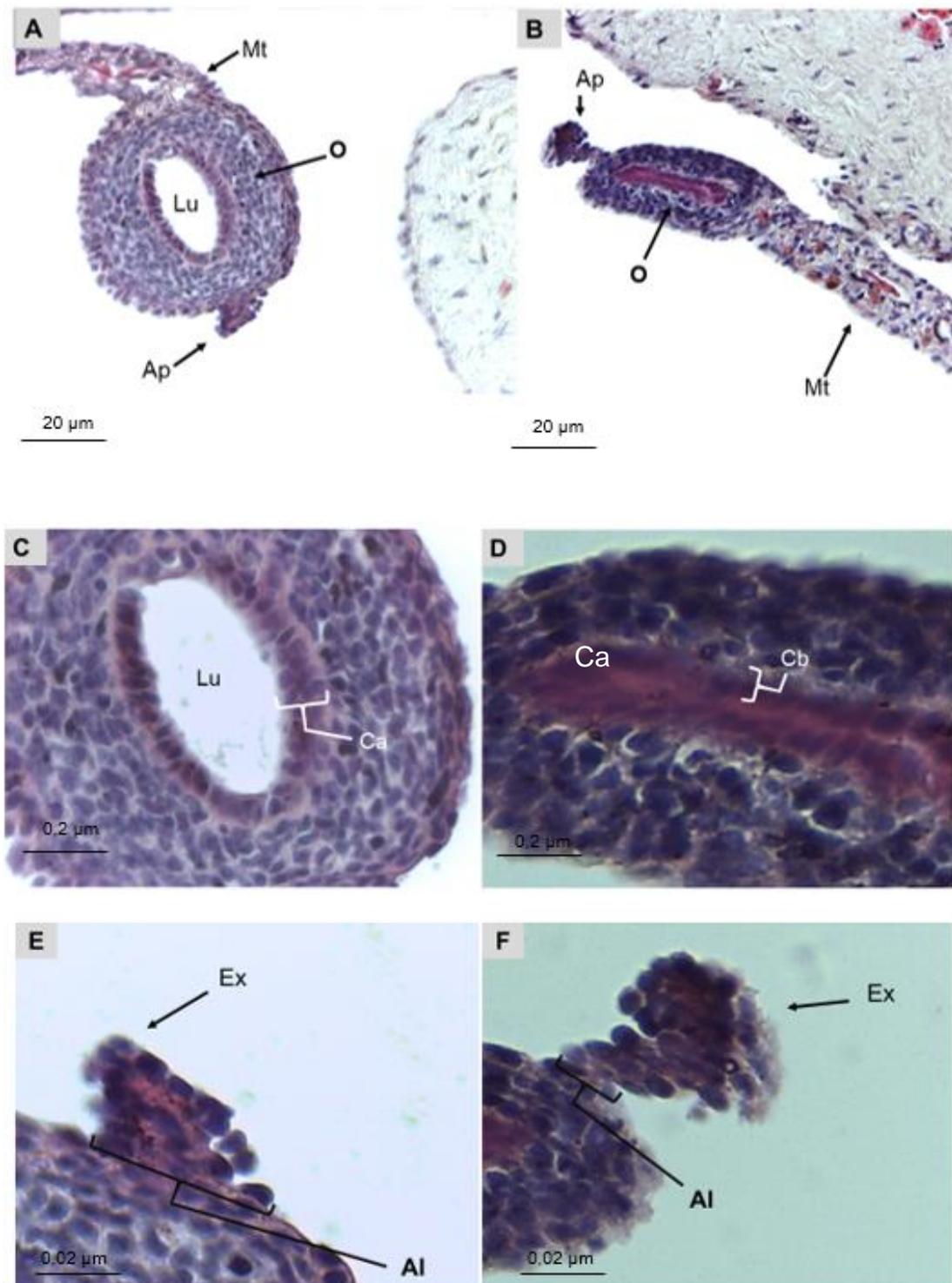


### 5.3.2- Ducto paramesonéfrico

O ducto paramesonéfrico nas fêmeas é revestido por epitélio colunar simples e células cúbicas altas, com perfil arredondado com lúmen aberto e mesentério fino e longo. Nos machos, apresenta-se revestido por células cúbicas baixa, com perfil elíptico alongada e caracterizado pela ausência de lúmen, mesentério curto e largo (Figura 10A-D).

Outra estrutura que através da avaliação histologia é possível realizar a diferencial sexual são os apêndices (Ap). Os apêndices são uma continuidade do tecido dos ovidutos. Nas fêmeas os apêndices apresentam um anel de ligação (Al) com oviduto com uma maior quantidade de células quando comparadas com o Al dos machos, que cria um sítio de anelamento com poucas células. Além disso, a extremidade (Ex) dos apêndices também apresenta diferenças entre os sexos. Nas fêmeas as Ex são pontiagudas, já nos machos as células se rearranjam formando uma estrutura arredondada (Figura 10 EF).

**Figura 10-** Fotomicrografia dos ductos paramesonéfrico de natimortos de *Eretmochelys imbricata* **A-** Ducto de uma fêmea. **B** – Ducto de um macho. **C** – Região central do ducto de uma fêmea. **D** - Região central do ducto de um macho. **E** – Apêndice de uma fêmea. **F** – Apêndice de um macho. **Mt** (Mesentério); **O** (Ducto); **Ap** (Apêndice); **Lu** (Lúmen); **Ca** (Células Cúbicas Altas); **Cb** (Células Cúbicas Baixas), **Al** (Anel de ligação), **Ex** (Extremidade), Hematoxilina e eosina.



### 5.3.3 Critérios microscópicos de identificação das gônadas e anexos

Vários critérios microscópicos foram utilizados para avaliação do dimorfismo sexual das amostras em estudo, como: morfologia do ducto paramesonéfrico, estruturas que alojam as células germinativas, morfologia das células do córtex e medula, morfologia das células germinativas e da extremidade distal de cada gônada (Tabela 2).

Além disso, as análises microscópicas permitiram identificar o sexo dos espécimes coletados no presente trabalho, onde observou-se uma proporção de razão sexual 5:1 fêmeas para macho.

**Tabela 2-** Critérios microscópicos de identificação das gônadas e anexos da *Eretmochelys imbricata*,

<b>Critérios</b>	<b>Macho</b>	<b>Fêmea</b>
<b>Ducto paramesonéfrico</b>	Alongado, revestido por células cúbicas baixas e presença de apêndice curto	Arredondado, revestido por células cúbicas altas e presença de apêndice longo
<b>Estruturas do leito germinativo</b>	Constituído por túbulos seminíferos de luz dilatada presentes em toda a gônada	Localizados principalmente na região cortical, próximo ao epitélio germinativo
<b>Córtex (Epitélio)</b>	Pouco desenvolvido ou inexistente.	Epitélio cuboide estratificada; Folículos com epitélio formado por células cúbicas
<b>Medula</b>	Nos túbulos seminíferos, com células de núcleo esférico, presença de nucléolo e citoplasma rico em prolongamentos apicais e uma membrana basal com células achatadas semelhantes as células mioides	Vasos: epitélio pavimentoso simples; Lacunas: envolvidas por tecido conjuntivo frouxo, revestidas por células pavimentosas
<b>Células germinativas</b>	Esféricas e aderidas ao epitélio dos túbulos seminíferos	A maioria posicionada na região cortical, próximo a lacunas e vasos sanguíneos
<b>Extremidade distal da gônada</b>	Contorno obtuso	Contorno agudo.

### 5.3.4- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Foram analisadas as microfotografias do testículo e ovário de filhotes recém eclodidos.

#### 5.3.4.1- Machos

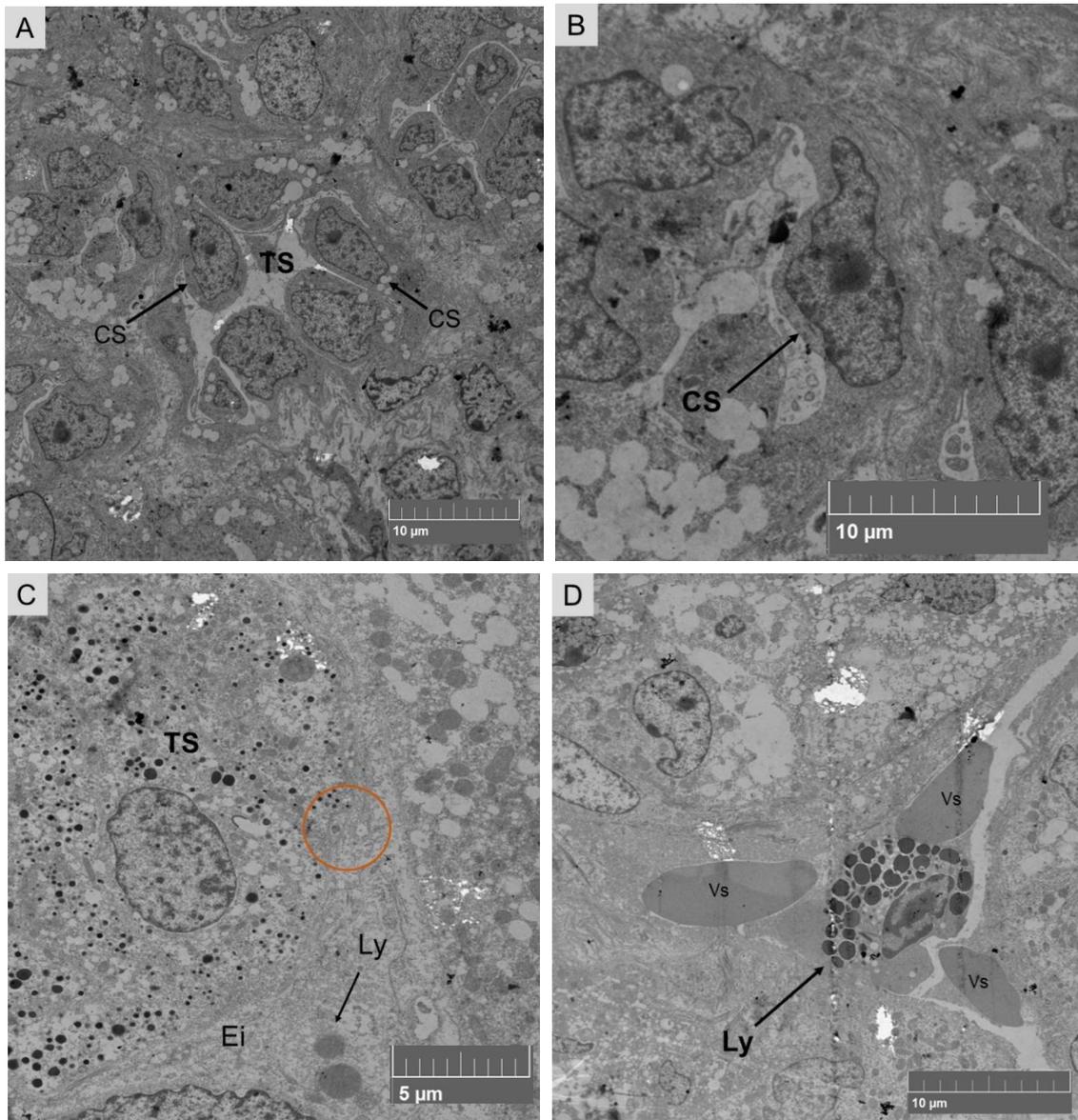
Nos machos, os túbulos seminíferos estavam formados (Figura 11 A, B), e uma luz foi visualizada no centro do túbulo. Associado aos túbulos também foi possível identificar a lâmina basal. Células pavimentosas com características de células mioides foram identificadas em íntima associação com a lâmina basal. (Figura 11 B). No interior do túbulo foram observadas células piramidais com pouca heterocromatina, citoplasma apical núcleo aproximadamente triangular e basal com nucléolo evidente, características essas de célula de Sertoli (CS) (Figura 11 A). No tecido conjuntivo intersticial foram observadas células com características de função endócrina com vesículas eletrodensas em seu interior, levando a sugerir que se trata de uma Célula de Leydig (Ly) (Figura 12 B). As Ly apresentavam núcleo arredondado, heterocromatina distribuída irregularmente e a presença de um nucléolo proeminente. Além disso, também foi possível observar células de leydig com gotículas lipídicas associadas a vasos sanguíneos (Vs) (Figura 11 C).

#### 5.3.4.2- Fêmeas

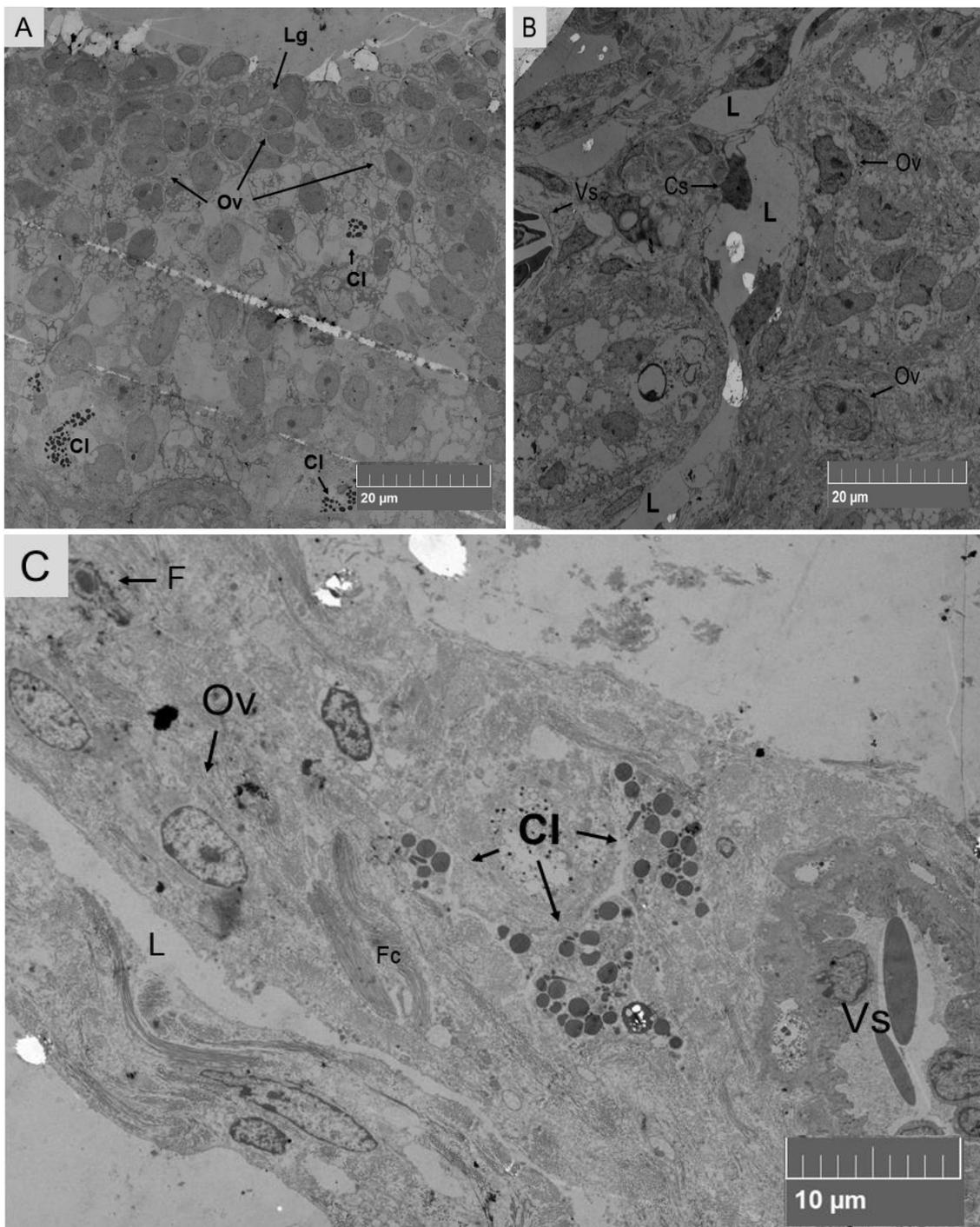
As células do epitélio germinativo são distribuídas aleatoriamente no córtex (Figura 12 A). O estroma consiste em uma associação de vasos sanguíneos, lacunas, fibroblastos, fibras de colágeno e músculo liso e células da linhagem germinativa (Figura 12 C). As lacunas são heterogêneas em tamanho e apresenta material amorfo no seu interior. Na maioria das vezes está associada a vasos sanguíneos e células germinativas, no caso as ovogônias (Figura 12 C). Também é possível visualizar a presença de células intersticiais secretoras (CI) que apresentava gotículas lipídicas (Figura 12 A B C)

No que se refere a linha germinativa, é possível observar células forma oval ou redondas grandes, com núcleo conspícuo e não central, citoplasma abundante, o qual foi caracterizada como ovogônias (Ov) (Figura 12 A).

**Figura 11** Eletrofotomicrografia de gônadas de machos natimortos de *Eretmochelys imbricata* **A-** Túbulo seminífero. **B-** Célula de Sertoli. **C** – Região testicular. **D** – Interstício. **TS:** (Túbulo seminífero); **CS:** (Célula de Sertoli); **Ly** (Células de Leydig); **Ei** (Espaço intersticial); **Círculo vermelho** (Célula mioide); **Vs:** Vasos sanguíneos.



**Figura 12-** Eletrofotomicrografia de gônadas de fêmeas natimortas de *Eretmochelys imbricata* **A-** Região cortical, leito germinativo e estroma. **B –** Estroma. **C-** Estroma. **Ov** (Ovogônias); **CI** (células intersticiais); **Eg** (Epitélio germinativo); **Vs** (Vaso sanguíneo); **F** (Fibroblasto); **Fc** (Fibras de colágeno); **Cs** (Células sanguíneas).



## 6-DISCUSSÃO

O referido trabalho descreve a morfologia gonadal de filhotes natimortos de *Eretmochelys imbricata* a partir da coleta de natimortos adquiridos de ambiente natural da praia de Cabo de São Roque, Rio grande do Norte, Brasil. Nessas condições, a observação macroscópica mostrou formas alongadas para as gônadas das fêmeas e ovoide para as gônadas dos machos, sendo uma alternativa viável de identificar o sexo em filhotes recém eclodido de *Eretmochelys imbricata*. Além disso, as gônadas de filhotes recém-eclodidos fêmeas dessa espécie são, superficialmente, mais vascularizadas do que as dos machos. Por meio das análises de microscopia de luz, verificou-se nos machos uma com túbulos seminíferos e fêmeas com ovogônias dispostas em folículos em organização. Na análise ultraestrutural evidenciou -se que nos machos no interior do túbulo foram observadas células piramidais com pouca heterocromatina, citoplasma apical núcleo alongado e basal com nucléolo evidente características essas de célula de Sertoli (CS). No tecido conjuntivo intersticial foram observadas células com características de função endócrina com vesículas eletrodensas em seu interior, levando a sugerir que se trata de uma Célula de Leydig (Ly). As Ly apresentavam núcleo arredondado, heterocromatina distribuída irregularmente e a presença de um nucléolo proeminente. E nas fêmeas o estroma consiste em uma associação de vasos sanguíneos, lacunas, fibroblastos, fibras de colágeno e músculo liso e células da linhagem germinativa. As lacunas são heterogêneas em tamanho e apresenta material amorfo no seu interior. Na maioria das vezes está associada a vasos sanguíneos e células germinativas. As ovogônias foram caracterizadas como células com forma oval ou redondas grandes, com núcleo conspícuo e não central e citoplasma abundante.

A macroscopia das gônadas tem sido utilizada para identificação do sexo de tartarugas. *Malvasio et al. (2002)* estudando *Podocnemis expansa* observaram que as gônadas das fêmeas se apresentavam mais ovoides, enquanto nos machos se mostravam mais alongadas. Em tartarugas marinhas, *Wyneken et al., (2007)* ao estudar filhotes de *Caretta caretta* observou que as gônadas estão emparelhadas e localizadas dentro da cavidade celômática, caudal aos pulmões e anexado ao peritônio. Os machos possuem uma gônada com forma ovoide, pouca mobilidade, cor amarela e com superfície lisa, já as fêmeas, as gônadas dobravam-se sobre si, apresentam uma flexibilidade, cor creme e com uma superfície lisa com alguns pontos granular. As gônadas de *E. imbricata* apresentaram diferença de forma, aspecto e coloração em relação ao sexo. Nos machos,

as gônadas também foram identificadas com superfície lisa, com cor branco opaco e formato aproximadamente ovoide. Além disso, apresentavam-se aparentemente mais estreitas que os ovários e geralmente não aderida a toda extensão do mesonefro. Nas fêmeas, as gônadas possuíam um aspecto granuloso, como uma estrutura com coloração variando de esbranquiçada para translúcida e com forma fusiforme alongada acompanhando toda extensão do mesonefro. Também foi possível observar que a gônada das fêmeas é mais vascularizada do que as dos machos, além de possuírem vasos com uma maior dilatação, o que explicaria o aspecto granular observado, pois ele pode estar associado a vasos linfáticos ou folículos em desenvolvimento (WYNEKEN et al., 2007). Portanto, nessa espécie a avaliação macroscópica gonadal se mostrou uma alternativa viável para determinar o sexo de animais recém-eclodidos.

A morfometria gonadal também tem sido utilizada para identificação do sexo de animais juvenis. Malvasio *et al.* (2011) verificaram que existem diferenças significativas entre as medidas (comprimento e largura) das gônadas de machos e fêmeas natimortos de *P. unifilis*. Já Gradela et al., (2020) notaram variação apenas na largura dos ovidutos do antímero direito e largura do antímero esquerdo de *Trachemys scripta elegans*. Fernandes Araujo Chaves et al., (2020) verificaram que ocorriam alterações até mesmo dentro do mesmo sexo em *Kinosternon scorpioides*, pois os machos variavam em relação ao diâmetro tubular e luminal e altura epitelial dos testículos, epidídimo e ductos deferentes apresentou alterações ao longo dos períodos estudados. A mensuração da maior largura das gônadas e mesonefros foi utilizada nesse estudo para verificar se existiu diferença significativa entre as gônadas masculina e feminina. No entanto, apesar das gônadas femininas serem mais largas não houve diferença estatística significativa em relação as gônadas masculinas, bem como a largura dos mesonefros direito e esquerdo. Isso mostra que apenas a utilização da morfometria das gônadas e mesonefro não é o suficiente para determinar o sexo em filhotes natimortos de *E. imbricata*.

Nesse contexto, a histologia gonadal ainda é o método mais seguro para identificação do sexo em tartarugas (SÖNMEZ et al., 2016), pois a organização microscópica parece se manter semelhantes entre as espécies. A histologia gonadal já foi descrita em tartarugas marinhas e de água doce, como *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* (MALVASIO et al., 2012), *Caretta caretta* (WYNEKEN et al., 2007; MENDES et al., 2017), *Chelonia mydas* (MARQUES, 2014) e *Lepidochelys olivácea* (VASCONCELOS, 2017). Em geral para essas espécies, os autores observaram que as

fêmeas apresentavam um córtex bem desenvolvido, rico em leitos germinativos e presença de ovogônias e uma região medular estruturalmente desorganizada, sendo observada uma vascularização evidente e espaços a qual foi caracterizado como lacunas. Enquanto, nos machos, uma medula preenchida de forma organizada com túbulos seminíferos, vasos sanguíneos, células de sertoli e leydig. Em *E. imbricata* observou-se uma organização microscopia semelhante para as gônadas de filhotes recém eclodidos. No entanto, esse é o primeiro trabalho que descrever a ultraestrutura das gônadas de natimortos dessa espécie. A avaliação ultraestrutural confirmou nossos achados microscópicos descritos para essa espécie.

Os ductos paramesonéfricos são um par de ductos do embrião que descem a partir do tecido mesodérmico. Nas fêmeas, desenvolvem-se para formar os ovidutos, e nos machos eles regridem (WYNEKEN et al., 2007). Kondak (2012) evidenciaram uma variação na organização estrutural na parede dos ductos de filhotes recém eclodidos de *Chelonia mydas* ao estudarem a determinação sexual da espécie. Miller & Limpus (2002) e Ceriani & Wyneken (2008) observou em *Caretta caretta*, *Chelonia mydas* e *Dermochelys coriácea* que as células dos ductos dos machos eram densas e desorganizada e que a ligação ao rim era curta. Em *E. imbricata* observamos características histológicas semelhantes. Nas fêmeas, o ducto apresentava-se revestido internamente por epitélio colunar simples, o lúmen deste ducto aberto e mesentério longo e fino. Sendo assim, eventualmente diferenciados dos machos, onde eles apresentavam ausência de lúmen e um mesentério curto e largo. Dessa forma, na ausência de tecido gonadal, o ducto paramesonéfrico, seria um tecido de eleição para reconhecimento de sexo, visto que apresentam diferenças entre os machos e as fêmeas.

Outra estrutura visualizada na microscopia de luz e que pode ser utilizada para diferenciação sexual em filhotes recém eclodidos é o apêndice do ducto paramesonéfrico. Os apêndices são uma continuidade do tecido do oviduto. Nas observações feitas por Malvasio et al. (2012), o apêndice remanescente em *Podocnemis expansa* mostrava-se variar entre os sexos e o mesmo tinha um comprimento proporcional à largura do oviduto. No presente estudo com *E. imbricata*, observamos que essa estrutura apresentava variações entre os sexos. Onde nas fêmeas são curtos e largos na base, apresentando uma extremidade pontiaguda e nos machos uma base afunilada, apresentando-se de forma alongada com uma extremidade arredondada. Dessa forma, os apêndices demonstram ser uma estrutura viável na identificação sexual.

Embora histologicamente as gônadas dos machos e fêmeas de tartaruga sejam diferentes durante a vida adulta, existem casos em que o indivíduo recém-eclodido ou natimorto pode apresentar rudimentos das estruturas características dos dois sexos (SCHROEDER et al., 2016). Durante a identificação do sexo estes indivíduos são considerados intersexos. O termo refere-se a um indivíduo de qualquer espécie que exhibe ambas as características de sexo masculino e feminino (LIMPUS et al., 2009; DIAZ-HERNANDEZ et al., 2020). Ao avaliar microscopicamente as gônadas de filhote recém-eclodido de *E. imbricata*, notamos que 2 indivíduos apresentavam características celulares de ambos os sexos, como ovogônias, túbulos seminíferos e córtex. Isso dificultou a determinação sexual desses indivíduos. Esse evento acontece, pois durante algum tempo durante a vida embrionária ocorre um estágio que a gônada se apresenta bipotencial, com características de ambos os sexos e no qual a temperatura terá papel importante no desenvolvimento (WARNER et al., 2020). Além disso, as gônadas podem apresentar variações no tamanho sem mostrar características específicas de ovários ou testículos, podendo ser facilmente confundida, apresentando um grau considerável de potenciais membros de ambos os sexos (MARQUES, 2014). No entanto, esse cenário de intersexismo parece não ser definitivo, onde posteriormente as gônadas se tornam especificamente testículos ou ovários, mantendo somente estruturas acessórias adequadas para um sexo ou outro e as que não são pertinentes, geralmente cessam o desenvolvimento e pode ser reabsorvida (DIAZ-HERNANDEZ et al., 2017). Dessa forma, esse fator, bem com plano de corte histológico, por nem sempre dispor as gônadas no sentido longitudinal, ou deixando somente o mesonefro em evidência, comprometem a identificação sexual por meio da microscopia de luz.

As observações ultraestruturais, foi visualizado uma estrutura condizente com lacunas. As lacunas são estruturas eletrodensas, situadas muito próximas as ovogônias e associadas aos vasos sanguíneos (PÉREZ-BERMÚDEZ et al., 2010). Essas estruturas devido a sua localização, representa um espaço para a expansão das ovogônias durante o desenvolvimento e uma rota de fuga para o aumento da pressão arterial na gônada e também podem servir de sustentação para as células germinativas (PÉREZ-BERMÚDEZ et al., 2012). As características observadas no sistema lacunar de filhotes recém-eclodido de *E. imbricata* condiz com a literatura, pois através das imagens ultraestruturais observou-se que elas estava associadas a vasos sanguíneos e a ovogônias, levando a supor que a mesma poderia participar da nutrição gonadal e um local para desenvolvimentos

das células germinativas, apoiando assim, o resultado encontrado por Chen et al., (1998), onde os autores disseram que este sistema poderia participar da nutrição gonadal.

A visualização do processo de esteroidogênese nas células é fundamental, pois durante a fase embrionária, a via metabólica dos estrogênios se inicia nas células esteroidogênicas, nas quais há síntese de hormônios sexuais precursores, a partir do colesterol (BARBAGALLO, 2020). Os hormônios esteroides captados por receptores de lipoproteínas nas membranas plasmáticas e transportados para o interior das mitocôndrias, onde sofrerão redução dos átomos de carbono pela enzima aromatase, produzida pelo gene termosensível P-450, constituindo-se um elemento importante durante a fase embrionária para a diferenciação sexual. Esta enzima age na gônada convertendo substrato de esteroide andrógeno em estrógeno, desempenhando um papel fundamental em muitas funções biológicas que dependem deste hormônio, incluindo a diferenciação sexual de embriões em desenvolvimento (CANESINI et al., 2018). No que se refere as células esteroidogênicas, evidenciou-se células com ultraestrutura indicativa de função endócrina tanto nos testículos com nos ovários de *E. imbricata*. As células esteroidogênicas apresentavam citoplasma marcado por vesículas eletrodensas, descritas previamente em células esteroidogênicas no ovário e testículo de tartarugas como *Podocnemis expansa* (MAGALHÃES et al., 2017), *Pelodiscus sinensis* (TARIQUE et al., 2019). Essas vesículas representam o acúmulo de ésteres de colesterol utilizados como substrato para síntese de hormônios esteroides (XIONG et al., 2020). A presença dessas células com citoplasma preenchido por essas vesículas e a relação dessas células com vasos sanguíneos e células germinativas são indicativos que as gônadas estão em alto processo de diferenciação.

Mascarenhas et al. (2005) ao estudar a influência da temperatura na razão sexual, verificaram na costa da Paraíba, uma maior proporção de fêmeas (6:1) para *Chelonia mydas*. Já Simões et al. (2014) relatou uma ocorrência de (6:1) para o litoral pernambucano, especificamente para a Praia de Merepe, onde os resultados dos seus estudos mostraram que as condições edafoclimáticas do local tendem a gerar um maior número de filhotes fêmeas. Nas observações feitas no presente estudo com *E. imbricata*, foi observada uma proporção de razão sexual de (5:1) fêmeas para macho, a mesma proporção foi confirmada por meio da análise microscópica. Mostrando que as alterações climáticas podem estar influenciando o aumento do nascimento de fêmeas de *E. imbricata*

do litoral nordestino. Assim, a avaliação da temperatura se mostra um passo valioso e de grande aplicabilidade no plano de manejo e conservação das populações desta espécie.

## 7-CONCLUSÕES

A observação macroscópica mostrou formas alongadas para as gônadas das fêmeas e ovoide para as gônadas dos machos, sendo uma alternativa viável de identificar o sexo em filhotes recém eclodido de *Eretmochelys imbricata*. Além disso, as gônadas de filhotes natimortos fêmeas dessa espécie são, superficialmente, mais vascularizadas do que as dos machos.

Dessa forma, tanto a avaliação macroscópica, microscópica e ultraestrutural se mostram técnicas efetivas e de confiança para a identificação sexual em filhotes natimortos. Também vale salientar que na ausência das gônadas a análise microscópica dos ductos paramesonéfricos e dos apêndices dos ductos representam uma alternativa para identificação sexual na espécie em questão.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBAGALLO F, CONDORELLI RA, MONGIOÌ LM, CANNARELLA R, AVERSA A, CALOGERO AE, LA VIGNERA S. Effects of Bisphenols on Testicular Steroidogenesis. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 30; 11:373. 2020.
- BILLET, F.; GANS, C.; MADERSON, P.F.A. Why study reptilian development? In: Gans C, Billet F, Maderson PFA, editors. *Biology of the reptilia. Development A*. Vol. 14. New York: **Wiley**. p 1-40, 1985.
- BLECHSCHMIDT, J.; WITTMANN, M.J.; BLÜML, C. Climate Change and Green Sea Turtle Sex Ratio—Preventing Possible Extinction. **Genes**,11, 588, 2020.
- BOLTEN, A. B. Active swimmers – passive drifters: the oceanic juvenile stage of loggerhead in the Atlantic system. In: BOLTEN, A. B. & WITHERINGTON, B. E. (ed). *Loggerhead Sea Turtles*. **Smithsonian Institution Press**. 63-78, 2003.
- BONACH, K. et al. Temperature-sex determination in *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae). **Iheringia, Goiânia**, 101 (3), 151-155, 2011.
- CANESINI, GUILLERMINA; RAMOS, JORGE GUILLERMO; MUÑOZ DE TORO, MONICA MILAGROS. Determinación sexual y diferenciación gonadal en Yacaré overo. Genes involucrados en su regulación y efecto de la exposición a perturbadores endocrinos; 22-3, 2018.
- CARRERAS, C.; PASCUAL, M.; TOMÁS, J.; MARCO, A.; HOCHSHEID, S.; CASTILLO, J. J.; GOZALBES, P.; PARGA, M.; CARDONA, L. Sporadic nesting reveals long distance colonisation in the philopatric loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). **Scientific Reports**, 8 (1), 1435, 2018.
- CASALE, P.; LAZAR, B.; PONT, S.; TOMÁS, J.; ZIZZO, N.; ALEGRE, F.; BADILLO, J.; DI SUMMA, A.; FREGGI, D. & LACKOVI, G. Sex ratios of juvenile loggerhead sea turtles *Caretta caretta* in the Mediterranean Sea. **Marine Ecology Progress Series**, 324: 281–285, 2006.
- CERIANI, S. A; WYNEKEN, J. Comparative morphology and sex identification of the reproductive system in formalin-preserved sea turtle specimens. **Zoology**, 111, 179–187, 2008.
- CHEN. F. Y.; HUA, T. M.; CHEN, B. H. Studies on the histochemical analysis of the eggs of *Pelodiscus sinensis*. **J Anhui Agric Sci**, 21, 232–244, 1998.

DELGADO, C. M. N. Gonad development and hormone titres in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the NE Atlantic. 2008. 164 f. **Tese** (Doutorado) - Universidade da Madeira, Portugal, 2008.

DIÁZ-HERNÁNDEZ, V., DOMINGUEZ-MORA, P., CHINO-PALOMO, L., MARMOLEJO-VALENCIA, A., HARFUSH, M., & MERCHANT-LARIOS, H. Spatiotemporal Expression of *Foxl2* and *Dmrt1* before, during, and after Sex Determination in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. **Sexual Development**, 13(5–6), 286–296, 2020.

DÍAZ-HERNÁNDEZ, V., VÁZQUEZ-GÓMEZ, A., MARMOLEJO-VALENCIA, A., MONTAÑO, L. M., & MERCHANT-LARIOS, H.  $17\beta$ -Estradiol modulates cell proliferation of medullary cords during ovarian differentiation of the *Lepidochelys olivacea* sea turtle. **Developmental Biology**, 431(2), 263–271, 2017.

DOMINGUES, M. K. Testando a existência de dimorfismo sexual na fase juvenil da Tartaruga-verde (*Chelonia mydas* Linnaeus, 1758) através da morfometria geométrica. Trabalho apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. 2015.

FABRÍCIO, M. A. S. Aspectos reprodutivos em tartarugas marinhas da bacia potiguar RN/CE. 2016. 70f. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Estrutural e Funcional) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

FARIAS, D. S. D. Tartarugas marinhas da bacia potiguar/RN: Diagnóstico, Biologia e Ameaças. **Dissertação** (Mestrado)- Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

FERNANDES ARAUJO CHAVES, L. P., VIANA, D. C., CHAVES, E. P., MIGLINO, M. A., & DE SOUSA, A. L. Reproductive morphophysiology of the male scorpion mud turtle (*Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766) in captivity. **Veterinary medicine and science**, 6(3), 570–578, 2020.

FERREIRA JÚNIOR, P.D. Aspectos ecológicos da determinação sexual em tartarugas. **Acta Amazonica**, 39:139–154, 2009.

FERREIRA-JÚNIOR, P.D.; TREICHEL, R. L.; SCARAMUSSA, T. L.; SCALFONI, J. T. Morphometric pattern in *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) (*Cheloniidae*) hatchlings from nests with different embryo development rates. **Brazilian Journal of Biology**, v.71, n.1, 2011.

FUENTES, M.; HAMANN, M.; LIMPUS, C. J. Past, current and future thermal profiles of green turtle nesting grounds: implications from climate change. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 383:56–64, 2010.

FUENTES, M.M.P.B.; LIMPUS, C.J.; HAMANN, M. Vulnerability of sea turtle nesting grounds to climate change. **Global Change Biology**, 17(1):140–153, 2011.

FUENTES, MARIANA M. P. B.; ALLSTADT, ANDREW J.; CERIANI, SIMONA A.; GODFREY, MATTHEW H.; GREDZENS, CHRISTIAN; HELMERS, DAVID; INGRAM, DIANNE; PATE, MICHELLE; RADELOFF, VOLKER C.; SHAVER, DONNA J.; WILDERMANN, NATALIE; TAYLOR, LOTEM; BATEMAN, BROOKE L. Potential adaptability of marine turtles to climate change may be hindered by coastal development in the USA. **Regional Environmental Change**, 20(3), 104, 2020.

GAVILAN-LEANDRO, S.A.C., PERETTI, D., PINTO-JÚNIOR, J.E.M., FERNANDES, M.A. and GURGEL-JÚNIOR, A.M. Espectro alimentar e variação sazonal da dieta de *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Osteichthyes, Sciaenidae) na lagoa do Piató, Assú, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 31(3), 285-292, 2009.

GEOFFREY, M.; WAPSTRA, E. Biologia do desenvolvimento: o movimento embrionário influencia a determinação do sexo em uma tartaruga. **Current Biology**, 29 (18), 883 – 886, 2019.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. 7<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, USA. 838p, 2003.

GODFREY, M. H.; D'AMATO, A. F.; MARCOVALDI, M. Â. & MROS-OVSKY, N. Pivotal temperature and predicted sex ratios for hatchling hawksbill turtles from Brazil. **Canadian Journal of Zoology**, 74(9): 1465-1473, 1999.

GRADELA, A., PIRES, I. C., MATOS, M. H. T., CORRÊA, F. M., FARIA, M. D., SILVA, J. S., MILANELO, L. Reproductive biology, morphology, and morphometry of ovaries and oviducts of *Trachemys scripta elegans* in Brazilian Cerrado. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, 40(2), 2020. 141–154.

HAMANN, M.; LIMPUS, C. J.; OWENS, D. W. Reproductive cycles of males and females. In: Lutz PL, Musick JA, Wyneken, J. (Ed.). *The Biology of sea turtle II*. Boca Raton, FL: **CRC Press**, 135-161, 2003.

HESNI M, TABIB M, HADI RAMAKI A. ecologia Assentamento e biologia reprodutiva da tartaruga-de-pente, *Eretmochelys imbricata*, em Kish Island, Golfo Pérsico. **J Mar Biol Assoc Reino Unido**. 96: 1373-1378, 2016.

KHUTSON, J. M.; LI R.; SOUTHWELL, R. M.; PETERSEN, B. L.; THORUP, J.; CORTES, D. Germ cell development in the postnatal testis: the key to prevent malignancy in cryptorchidism? **Frontiers in endocrinology**, 3: 1-11, 2012.

IUCN. Red list for threatened species. **Versão 2019-1**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acessado em 05/05/2019.

KAMEL, S. J.; MROSOVSKY, N. Deforestation: Risk of sex ratio distortion in hawksbill sea turtles. **Ecological Applications**, 16 (3), 923-931, 2006.

KAWAGOSHI, T.; NISHIDA, C.; MATSUDA, Y. A origem e o processo de diferenciação dos cromossomos X e Y da tartaruga do pântano negro (*Siebenrockiella crassicollis*, Geoemydidae, Testudines). *Chromosome Res* 20, 95-110, 2012.

KOBAYASHI, S.; WADA, M.; FUJIMOTO, R.; KUMAZAWA, Y.; ARAI, K.; WATANABE, G.; SAITO, T. The effects of nest incubation temperature on embryos and hatchlings of the loggerhead sea turtle: Implications of sex difference for survival rates during early life stages. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 486:274–281, 2017.

KOLANDAIVELOO, V., KALAISELVAM, R., FONG, M., MUSTAPA, M. S., SOUCE, R. M., SUGNASEELAN, S., WATANABE, M., LAU, M. M., SHARMA, D., & SHARMA, R. Endoscopy gender determination and reproductive hormone profiles of Painted Terrapins (*Batagur borneoensis*) subjected to ex situ incubation. **The Journal of veterinary medical science**, 82(4), 497–502, 2020.

KONDAK, H. C. Análise da proporção sexual e do desenvolvimento gonadal da tartaruga verde, *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no litoral norte e médio do Rio Grande do Sul. **Master's dissertation**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 41p, 2012.

LALOË, J.O.; COZENS, J.; RENOM, B.; TAXONERA, A.; HAYS, G.C. Climate change and temperature-linked hatchling mortality at a globally important sea turtle nesting site. **Global Change Biology**, 23(11):4922–4931, 2017.

LIMPUS, C. J., LIMPUS, D. J., READ, M. A., & FITZSIMMONS, N. N. When Is a male turtle not a male? Observations on intersex turtles. **Chelonian Conservation and Biology**, 8(1), 102–105, 2009.

LOPEZ, G.G.; SALIÉS, E.D.C., LARA, P.H., TOGNIN, F., MARCOVALDI, M.A.; SERAFINI, T.Z. Coastal development at sea turtles nesting ground: Efforts to establish a tool for supporting conservation and coastal management in northeastern Brazil. *Ocean & Coastal Management*, 116:270–276, 2015.

- LUTCAVAGE, M. E.; LUTZ, P. L. Diving Physiolog. in: Lutz, P. L. and MUSICK, J. A. (eds.). **The biology of Sea Turtles**. boca Raton, fl:CRC Press. 277–296, 1997.
- MAGALHÃES, M. S. Desenvolvimento embrionário de *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae): descrição do pronefro e mesonefro e diferenciação gonadal em ambiente natural, Balbina, Amazonas. Tese (Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2017.
- LUTZ, P. L.; MUSICK J. A.; WYNEKEN, J. (Ed.). *The biology of sea turtles II*. Boca Raton, FL:CRC Press, 503, 2003.
- MALVASIO, A., NASCIMENTO-ROCHA, J. M. DO, SANTOS, H. D., ATAÍDES, A. G. DE, & PORTELINHA, T. C. G. Morphometry and histology of the gonads of males and females hatchlings of *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 34(1), 105-112, 2011.
- MALVASIO, A.; ROCHA, J. M. N.; SANTOS, H. D. Morfometria e histologia das gônadas de machos e fêmeas recém-eclodidos de *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae). *Acta Scientiarum*, 34(1): 105- 112, 2012.
- MALVASIO, A.; SOUZA, A. M.; REIS, E. S.; FARIAS, E. C. Morfologia dos órgãos reprodutores de recém eclodidos de *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) e *P. unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Pelomedusidae). **Publicações avulsas – Instituto Pau Brasil de História Natural**, n. 5, p. 27-37, 2002.
- MANOLAKOU, P.; ANGELOPOULOU, R.; LAVRANOS, G. Sex Determinants in the Genome—Lessons from the Animal Kingdom. *Collegium Antropologicum*, 3: 649-652, 2006.
- MARCO, A., ABELLA, E., MARTINS, S., LÓPEZ, O., & PATINO-MARTINEZ, J. Female nesting behaviour affects hatchling survival and sex ratio in the loggerhead sea turtle: implications for conservation programmes. **Ethology Ecology & Evolution**, 30(2):141–155, 2018.
- MARCOVALDI, M. A. A. G; Santos, A. S.; Sales, G. **Plano de ação nacional para a conservação das Tartarugas Marinhas**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - Icmbio, 120, 2011.
- MARCOVALDI, M. A.; CHALOU PKA, M. Conservation status of the loggerhead sea turtle in Brazil: an encouraging outlook. **Endangered Species Research**. 3, 133-143, 2007.

MARQUES, A. M. C. Que influência tem a localização do ninho na proporção de sexos da espécie tartaruga-verde (*Chelonia mydas*), na ilha de Poilão, Guiné-Bissau? **Dissertação** (Biologia da Conservação) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 2014.

MARQUEZ, R.M. FAO Species Catalogue. Vol. 11. Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtles species know to date. **FAO Fis Syn.** 11 (125), 81, 1990.

MASCARANHAS, R.; SANTOS, R.; ZEPPELINI, D. 2005. Stranded sea turtles on the coast of Paraíba – Brazil. **Marine Turtle Newsletter.** 107: 13 22-41, 2005.

MATSUMOT, Y.; CREWS, D. Molecular mechanisms of temperature-dependent sex determination in the context of ecological developmental biology. **Mol Cell Endocrinol,** 354(1-2):103-10, 2012.

MENDES, S. S. Morfometria geométrica e histologia: ferramentas complementares na estimativa do sexo de filhotes da tartaruga marinha *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) (Testudines, Cheloniidae) dos estados da Bahia e do Espírito Santo. 2017.

MERCHANT-LARIOS, H.; FIERRO, I. V.; URRUIZA, B. C. Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. **Herpetol Monogr,** 3:43-61, 1989.

MILLER, J. D., AND C. J. LIMPUS. Ontogeny of Marine Turtle Gonads. **The biology of sea turtles,** 2:199, 2002.

MILLER, S.; DERENNE, A.; ELLIS-FELEGE, S.; RHEN, T. Incubation temperature and satiety influence general locomotor and exploratory behaviors in the common snapping turtle (*Chelydra serpentina*). **Physiol Behav.** 1;220:112875, 2020.

MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. Princípios de morfometria geométrica. 1ed. SP: Holos, 1999.

MOORE, B. C.; URIBE-ARANZÁBAL, M. C.; BOGGS, A. S.; GUILLETTE, L. J. Developmental morphology of the neonatal alligator (*Alligator mississippiensis*) ovary. **Journal of morphology,** 269(3), 302-312, 2008.

MORENO-MENDOZA N, HARLEY VR, MERCHANT-LARIOS H. Temperature regulates SOX9 expression in cultured gonads of *Lepidochelys olivacea*, a species with temperature sex determination. **Dev Biol.** 229(2), 319-326. 2001.

MORTIMER, J. A.; BRESSON, R. Temporal distribution and periodicity in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Cousin Island, Republic of Seychelles, 1971-1997. **Chelonian Conservation and Biology.** 3(2), 318-325. 1999.

MROSOVSKY, N. Sex ratios of sea turtles. **Journal of Experimental Zoology**, 270:16–27, 1994.

MUELLER, MIRIAM S.; RUIZ-GARCÍA, NORMA ADANARY; GARCÍA-GASCA, ALEJANDRA; ABREU-GROBOIS, F. ALBERTO. Best swimmers hatch from intermediate temperatures: Effect of incubation temperature on swimming performance of olive ridley sea turtle hatchlings. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 519(), 151186, 2019.

MYERS, E. M.; JANZEN, F. J.; ADAMS, D. C.; TUCKER, J. K. Quantitative genetics of plastron shape in slider turtles (*Trachemys scripta*). **Evolution**, 60(3), 563 – 572, 2006.

OLIVEIRA, G. C. S. Evidência de retardo no pico de desova da tartaruga de pente na costa sul do Rio Grande do Norte. 2018. 65f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

OTSUKA, S.; SUZUKI, M.; KAMEZAKI, N.; SHIMA, T.; WAKATSUKI, M.; KON, Y. & OHTAISHI N. Growth-Related changes in histology and immunolocalization of steroid hormone receptors in gonads of the immature male green turtle (*Chelonia mydas*). **Journal Of Experimental Zoology**, 309: 166-174, 2008.

PÉREZ-BERMÚDEZ, E.; RUIZ-URQUIOLA, A.; LEE-GONZÁLEZ, I. Histología gonadal y criterios fenotípicos de maduración en las tortugas marinas *Chelonia mydas* y *Eretmochelys imbricata* (Testudines: Cheloniidae) de Cuba. **Rev Biol Trop** 58:287–298, 2010.

PÉREZ-BERMÚDEZ, E.; RUIZ-URQUIOLA, A.; LEE-GONZÁLEZ, I.; PETRIC, B.; ALMAGUER-CUENCA, N.; SANZ-UCHOTORENA, A.; ESPINOSA-LÓPEZ, G. Ovarian follicular development in the hawksbill turtle (*Cheloniidae*: *Eretmochelys imbricata* L.). **Journal of morphology**, 273(12), 1338–1352, 2012.

PÉREZ-BERMÚDEZ, P.; GARCIA, A.; TUÑÓN, I.; GAVIDIA, I. *Digitalis purpurea* P5bR2, encoding steroid 5b-reductase, is a novel defense-related gene involved in cardenolide biosynthesis. **New Phytologist**, 687-700, 185, 2010.

PHAM, C.K.; RODRÍGUEZ, Y.; DAUPHIN, A.; CARRIÇO, R.; FRIAS, J.P.; VANDEPERRE, F. Plastic ingestion in oceanic-stage loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) off the North Atlantic subtropical gyre. **Marine Pollution Bulletin**, 121(1–2):222–229, 2017.

PIEAU, C.; DORIZZI, M.; RICHARD-MERCIER, N. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 55(6): 887-900, 1999.

PINTO, J. R. S.; OLIVEIRA, P. H. G. Proteção e monitoramento das áreas de reprodução de quelônios no rio Uatumã, no criador científico, nas praias artificiais, e nas praias naturais com participação comunitária através de ações socioambientais. Relatório de ações gerais no monitoramento de quelônios do CPPQA correspondentes ao período de março de 2013 a dezembro de 2014. 28p, 2015.

RAMSEY, M.; CREWS, D. 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, 2009.

RHEN T.; SCHROEDER A. Molecular mechanisms of sex determination in reptiles. **Sex Dev** 4:16–28, 2010.

RIBEIRO, I. F. S. Alterações dos parâmetros biométricos e reprodutores das tartarugas marinhas de São Tomé nas últimas duas décadas. **Tese de mestrado em Biologia da Conservação**, apresentada à Universidade de Lisboa, através da Faculdade de Ciências, em 2018.

ROHLF, J. F.; MARCUS, L. F. A revolution in morphometrics. **Tree**, 8 (4), 129-132, 1993.

ROSA, L. Biologia reprodutiva da tartaruga marinha *Chelonia mydas* no litoral paranaense. **Monografia**. Universidade Federal do Paraná. 28p, 2005.

SÁNCHEZ-CHARDI, A.; RIBEIRO, C. A. O.; NADAL, J. Metals in liver and kidneys and the effects of chronic exposure to pyrite mine pollution in the shrew *Crocidura russula* inhabiting the protected wetland of Doñana. *Chemosphere*, 76(3), 387- 394, 2009.

SANTOS, A.J.B.; BELLINI, C.; VIEIRA, D.H.G.; NETO, L.D.; CORSO, G. Northeast Brazil shows highest hawksbill turtle nesting density in the South Atlantic. **Endangered Species Research (Print)**, 21: 25 - 32, 2013.

SANTOS, M. R. D. Mudanças climáticas e as implicações para tartarugas-marinhas. Vila Velha: Instituto de Ensino, Pesquisa e Preservação Ambiental Marco Daniel, 2009.

SCHROEDER, A. L., METZGER, K. J., MILLER, A., & RHEN, T. A novel candidate gene for temperature-dependent sex determination in the common snapping turtle. **Genetics**, 203(1), 557–571, 2016.

SIMÕES, T.; SILVA, A.; SANTOS, E.; CHAGAS, C. Temperatura de incubação e razão sexual em filhotes natimortos da tartaruga marinha *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus,

1766) no município de Ipojuca, Pernambuco, Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, 54 (25): 363-374, 2014.

SÖNMEZ, B.; TURAN, C.; OZDILEK, S. Y.; TURAN, F. Sex determination of green sea turtle (*Chelonia mydas*) hatchlings on the bases of morphological characters. **J. Black Sea/Mediterranean Environment**, Vol. 22, No. 1: 93-102, 2016.

SOUZA, N.L.N.; CARNEIRO, M.T.W.D.; PIMENTEL, E.F.; FROSSARD, A.; FREIRE, J.B.; ENDRINGER, D.C.; FERREIRA JÚNIOR, P.D. Trace elements influence the hatching success and emergence of *Caretta caretta* and *Chelonia mydas*. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 50:117–122, 2018.

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

SWIGGS, J.; PALADINO, F.V.; SPOTILA, J.R.; TOMILLO, P.S. Depth of the drying front and temperature affect emergence of leatherback turtle hatchlings from the nest. **Marine Biology**, 165:91, 2018.

TARIQUE, I., VISTRO, W. A., BAI, X., YANG, P., HONG, C., HUANG, Y., ... CHEN, Q. LIPOPHAGY: A novel form of steroidogenic activity within the LEYDIG cell during the reproductive cycle of turtle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 17(1), 2019.

VALENZUELA, N.; ADAMS, D.C.; BOWDEN, R.M.; GAUGER, A.C. Geometric morphometric sex estimation for hatchling turtles: A powerful alternative for detecting subtle sexual shape dimorphism. **Copeia**, 4:735-742, 2004.

VOGT, R.C. Temperature controlled sex determination as a tool for turtle conservation. **Chelonian Conservation and Biology**. 1(2):159-162, 1994.

WARNER, D. A., MITCHELL, T. S., BODENSTEINER, B. L., & JANZEN, F. J. Sex and incubation temperature independently affect embryonic development and offspring size in a turtle with temperature-dependent sex determination. **Physiological and Biochemical Zoology**, 93(1), 62–74, 2020.

WIBBELS, T.; BULL, J. J.; CREWS, D. Synergism between temperature and estradiol: a common pathway in turtle sex determination? **Journal Exp Zool**, 260:130-134, 1991.

WYNEKEN, J. **The Anatomy of Sea Turtles**. 1 ed. U.S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum, 2001.

WYNEKEN, J; EPPERLY, S. P; CROWDER, L. B; VAUGHAN, J, BLAIR ESPER, K. Determining sex in posthatchling loggerhead sea turtles using multiple gonadal and accessory duct characteristics. **Herpetologica** 63:19–30, 2007.

XIONG, L., YANG, M., ZHENG, K., WANG, Z., GU, S., TONG, J., ... NIE, L. Comparison of Adult Testis and Ovary MicroRNA Expression Profiles in Reeves' Pond Turtles (*Mauremys reevesii*) With Temperature-Dependent Sex Determination. **Frontiers in Genetics**, 11, 2020.

YAZAWA, T.; IMAMICHI, Y.; MIYAMOTO, K.; UWADA, J.; KHAN, M. R. I.; TANIGUCHI, T. Overviews of stem cells for gonadal and adrenal steroidogenic cells. **American Journal of Life Sciences**, 3(3-2): 58-64, 2015

YNTEMA, C. L.; MROSOVSKY, N. Sexual differentiation in hatchling loggerheads *Caretta caretta* incubated at different controlled temperatures. **Herpetologica**, 36: 33-36, 1980.

ZHANG, JUN; YU, PENG; LIU, TIANTIAN; QIAO, DAN; HU, QINGTAO; SU, SHIPING. Identification and functional analysis of SOX transcription factors in the genome of the Chinese soft-shell turtle (*Pelodiscus sinensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 242(), 110407, 2020.

## 9. ANEXOS



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 64308-2	Data da Emissão: 10/09/2019 16:41:55	Data da Revalidação*: 01/08/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Lucas Gabriel Veríssimo Pinheiro da Silva	CPF: 082.047.744-35
Título do Projeto: Projeto Tartarugas ao Mar	
Nome da Instituição: ASSOC. DE PROTEÇÃO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL CABO DE SÃO ROQUE	CNPJ: 26.092.697/0001-61

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coletar amostras biológicas	12/2018	07/2023
2	Promover a sensibilização e educação ambiental	12/2018	07/2023
3	Levantamento do censo demográfico das espécies	12/2018	07/2023
4	Publicar os resultados	08/2018	07/2023
5	Apresentação em eventos	12/2018	07/2023
6	Registrar e atender os encalhes (vivos e/ou mortos)	12/2018	07/2023
7	Marcação de juvenis e adultos	12/2018	07/2023
8	Coletar os dados biométricos dos juvenis e adultos	12/2018	07/2023
9	Entrega de relatório SISBIO	08/2018	07/2023
10	Monitorar as práticas das atividades de pescas	12/2018	07/2023

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Isadora Natália Rocha Barreto	Coordenadora de Campo	106.365.804-74	Brasileira



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 64308-2	Data da Emissão: 10/09/2019 16:41:55	Data da Revalidação*: 01/08/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Lucas Gabriel Veríssimo Pinheiro da Silva	CPF: 082.047.744-35
Título do Projeto: Projeto Tartarugas ao Mar	
Nome da Instituição: ASSOC. DE PROTEÇÃO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL CABO DE SÃO ROQUE	CNPJ: 26.092.697/0001-61

#### Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 64308-2	Data da Emissão: 10/09/2019 16:41:55	Data da Revalidação*: 01/08/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Lucas Gabriel Veríssimo Pinheiro da Silva	CPF: 082.047.744-35
Título do Projeto: Projeto Tartarugas ao Mar	
Nome da Instituição: ASSOC. DE PROTEÇÃO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL CABO DE SÃO ROQUE	CNPJ: 26.092.697/0001-61

#### Outras ressalvas

1	Prezado pesquisador, O local proposto para sua pesquisa poderá sobrepor a uma área já monitorada por outras instituições. Diante do exposto, recomendo que faça contato prévio com essas instituições. As atividades de marcação de tartarugas marinhas autorizadas nesta licença só poderão ser realizadas mediante formalização de protocolo de cessão de marcas com o Centro Tamar-ICMBIO, utilizando marcas com a sequência alfanumérica fornecidas por este Centro. Este protocolo deverá ser apresentado em conjunto com a licença. Todos os dados de marcação deverão ser regularmente inseridos no Banco de Dados para Conservação das Tartarugas Marinhas – BDCTAMAR. Para viabilizar este procedimento, solicitamos que o pesquisador entre em contato com o TAMAR pelo e-mail: cecilia.baptistotte@icmbio.gov.br	TAMAR Vitória/ES
---	---	------------------

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Praia de Barra de Maxaranguape	Maxaranguape-RN	Marinho	Não	Fora de UC Federal
2	Praia Cabo de São Roque	Maxaranguape-RN	Marinho	Não	Fora de UC Federal
3	Praia de Maracaju	Maxaranguape-RN	Marinho	Não	Fora de UC Federal
4	Praia de Caraúbas	Maxaranguape-RN	Marinho	Não	Fora de UC Federal
5	Praia de Porto-Mirim	Ceará-Mirim-RN	Marinho	Não	Fora de UC Federal
6	Praia de Muriú	Ceará-Mirim-RN	Marinho	Não	Fora de UC Federal
7	Praia de Jacumã	Ceará-Mirim-RN	Marinho	Não	Fora de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Caretta caretta	5
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Caretta caretta	-
3	Marcação de animais silvestres in situ	Caretta caretta	-
4	Captura de animais silvestres in situ	Caretta caretta	-
5	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chelonia mydas	-
6	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Chelonia mydas	20
7	Captura de animais silvestres in situ	Chelonia mydas	-
8	Marcação de animais silvestres in situ	Chelonia mydas	-
9	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Dermodochelys coriacea	1
10	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Dermodochelys coriacea	-
11	Marcação de animais silvestres in situ	Dermodochelys coriacea	-
12	Captura de animais silvestres in situ	Dermodochelys coriacea	-
13	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Eretmodochelys imbricata	15



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 64308-2	Data da Emissão: 10/09/2019 16:41:55	Data da Revalidação*: 01/08/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Lucas Gabriel Veríssimo Pinheiro da Silva	CPF: 082.047.744-35
Título do Projeto: Projeto Tartarugas ao Mar	
Nome da Instituição: ASSOC. DE PROTEÇÃO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL CABO DE SÃO ROQUE	CNPJ: 26.092.697/0001-61

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
14	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Eretmochelys imbricata	-
15	Captura de animais silvestres in situ	Eretmochelys imbricata	-
16	Marcação de animais silvestres in situ	Eretmochelys imbricata	-
17	Captura de animais silvestres in situ	Lepidochelys olivacea	-
18	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Lepidochelys olivacea	-
19	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Lepidochelys olivacea	10
20	Marcação de animais silvestres in situ	Lepidochelys olivacea	-

#### Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Tartarugas marinhas)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fezes, Ovos, Sangue, Regurgitação/conteúdo estomacal, Fragmento de tecido/órgão
2	Método de captura/coleta (Tartarugas marinhas)	Captura manual
3	Método de marcação (Tartarugas marinhas)	Anilha, Foto-identificação

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	ASSOC. DE PROTEÇÃO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL CABO DE SÃO ROQUE	Outro