



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

Development and gonadal differentiation in embryos of Podocnemis unifilis (Testudines: Podocnemididae) at controlled temperature

Maria Fabiele Silva Oliveira^{1*}, Lucas Castanhola Dias¹, Carlos Eduardo Bezerra de Moura²,
†Richard Carl Vogt^{1(In memoriam)}, Marcela dos Santos Magalhães^{1,3}

¹ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil

² Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Departamento de Ciências Animais, Mossoró, Rio Grande do Norte³
Universidade Federal do Amazonas, Departamento de Morfologia, Manaus, Amazonas, Brasil

Resumo

Esse estudo objetivou caracterizar o desenvolvimento e a diferenciação gonadal de *Podocnemis unifilis* em temperatura controlada de 32°C em incubadora artificial e com controle de umidade feito por um higrômetro interno. Foram realizadas análises macroscópicas, por microscopia de luz e por microscopia eletrônica de transmissão. O desenvolvimento gonadal foi agrupado em três etapas: células germinativas primordiais (CGP), estabelecimento da gônada indiferenciada e diferenciação gonadal. As CGP só foram visualizadas a partir do 7º dia de incubação, e se encontravam na região caudal do corpo do embrião, e entre os dias 9 e 11 de incubação foi possível observar a migração das CGP a partir do saco vitelínico em direção à região ventromedial do mesonefro. Com 20 dias de desenvolvimento, a gônada indiferenciada estava estabelecida, sendo identificadas duas regiões distintas: a região cortical externa, caracterizada pela presença de CGP, e a região medular interna, marcada por cordões sexuais primitivos. Nesse estudo, a diferenciação gonadal só ocorreu em testículo. A diferenciação teve início após 35 dias de incubação, com o início da organização dos cordões sexuais em túbulos seminíferos. As etapas de diferenciação gonadal foram semelhantes às de outras espécies de quelônios com determinação do sexo pela temperatura, no entanto, neste estudo, usando a temperatura pivotal descrita para a espécie, todos os indivíduos analisados diferenciaram-se em machos, sendo necessária, portanto, a realização de mais estudos com diferentes temperaturas.

Palavras-chave: Determinação sexual, tracajá, quelônios.

Abstract

This study aimed to characterize the development and gonadal differentiation of Podocnemis unifilis at a controlled temperature of 32° C in artificial incubator and with humidity control performed by an internal hygrometer. Macroscopic analyzes, light microscopy and transmission electron microscopy were performed. We grouped gonadal development into three stages: primordial germ cells (PGC), establishment of the undifferentiated gonad and gonadal differentiation. We only visualized the PGC from the 7th day of incubation, and in the caudal region of the embryo body; between days 9 and 11 of incubation we were able to observe the migration of the PGC from the viteline sac towards the ventromedial region of the mesonefro. At 20 days of development, the undifferentiated gonad was established and two distinct regions were identified: the external cortical region characterized by the presence of PGC, and the internal medullary region marked by primitive sexual cords. In this study, only gonadal differentiation occurred in the testicle. Gonadal differentiation began after 35 days of incubation with the beginning of the organization of sexual cords in the seminiferous tubules. The stages of gonadal differentiation were similar to those of other species of turtles with temperature determined sex, however in this study, using the pivotal temperature described for the species all the individuals analyzed were males, and it is there for necessary to carry out further studies using a higher incubation temperature.

Keywords: Sexual determination, Yellow-Spotted Amazon River Turtle, turtles.

Introdução

A conservação das espécies de quelônios amazônicos é importante não apenas por manter a diversidade biológica neste bioma, mas também pelo papel histórico e atual destes animais como recurso

*Correspondência: fabielesilva78@gmail.com

Recebido: 02 de abril de 2020

Aceito: 12 de março de 2021



alimentar e fonte de proteína para as populações ribeirinhas (Vogt, 1994). Entretanto, para o desenvolvimento eficiente dos métodos de conservação dos quelônios amazônicos, é necessário o conhecimento acerca da biologia reprodutiva, bem como da influência da temperatura no desenvolvimento e diferenciação gonadal destes. Portanto, a determinação do mecanismo térmico de espécies com determinação sexual dependente da temperatura (TSD), juntamente com estudos morfológicos da caracterização gonadal, são ferramentas que auxiliam em pesquisas para elaboração de estratégias de manejo, incluindo transplantes de ninho e programas de incubação seminatural (Hildebrand et al., 1997).

Atualmente, é consensual que a temperatura é o elemento principal da determinação sexual de inúmeras espécies de tartarugas (Ferreira Júnior, 2009), podendo ser influenciada por fatores como: localização, composição, tamanho e granulometria do sedimento do ninho (Bull e Vogt, 1981), condições climáticas (Naro-Maciel et al., 1999), local de desova (Miller et al., 2004), profundidade do ninho e a vegetação local (Ferreira Júnior, 2003).

Em um intervalo de tempo denominado de período termossensível (TSP), a temperatura influencia o sexo do indivíduo e, durante esse período, que ocorre entre 18% a 30% do desenvolvimento embrionário (Pieau et al., 1999; Rhen et al., 2015), acontece a diferenciação sexual dos embriões, ou seja, a temperatura mais importante para a determinação do sexo durante o processo de incubação é a que for sentida pelos embriões durante o TSP. As mudanças de temperaturas experimentadas antes e depois desse período podem afetar a taxa de desenvolvimento, mas não exercerão influência sobre a diferenciação gonadal dos embriões (Ferreira Júnior, 2009). Existe uma temperatura na qual ocorrerá a mesma chance de formação de ambos os sexos, em proporções iguais (50% de machos e 50% de fêmeas ou razão sexual de 1:1), sendo essa temperatura denominada de pivotal ou central (Yntema e Mrosovsky, 1982).

Estudos voltados para a ecologia reprodutiva evidenciaram que filhotes de *Podocnemis unifilis* (tracajá) apresentam determinação sexual dependente da temperatura durante a incubação dos ovos (TSD), estando o predomínio de fêmeas ligado a temperaturas mais altas, e o quantitativo maior de machos relacionado a temperaturas mais baixas (Souza e Vogt 1994). A temperatura de 32°C foi considerada a pivotal para incubação da espécie em ninhos com temperaturas constantes (Souza e Vogt, 1994), no entanto, pequenas variações em torno dessa temperatura podem afetar a determinação sexual dos embriões (Bull, 1980; Ferreira Júnior, 2009). Trabalhos sobre a influência da temperatura na determinação do sexo e a biologia reprodutiva de quelônios têm sido cada vez mais frequentes; no entanto, pesquisas sobre desenvolvimento e diferenciação sexual ainda são escassas, principalmente no que se refere a espécies amazônicas, tendo apenas dois trabalhos disponíveis com *P. expansa* (Hildebrand et al., 1997; Magalhães, 2017). Diante disso, o presente artigo teve por objetivo descrever o desenvolvimento e a diferenciação das gônadas de *Podocnemis unifilis* em temperatura controlada.

Material e Métodos

Declaração do comitê de ética e SISBIO

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

Coleta e incubação dos ovos

Os ovos foram coletados em outubro de 2018 em parceria com a equipe do Projeto Pé-de-Pincha, na comunidade Granja Ceres (2° 53' 08"S e 57° 03' 34"W), pertencente à cidade de Barreirinha – AM (2° 44' 49"S e 42° 49' 33"W), onde o monitoramento das populações de quelônios pelo projeto Pé-de-Pincha foi iniciado em 2004 (Andrade, 2015). Após a identificação do ninho de desova recente de *P. unifilis*, os ovos foram retirados do ninho, identificados de acordo com o ninho coletado e armazenados em caixas de isopor de 17 litros contendo areia da praia de desova para evitar que ocorresse movimentação dos ovos dentro da caixa durante o transporte. No total, 100 ovos de *P. unifilis* foram transportados até a cidade de Manaus para a realização do estudo.



O processo de incubação foi realizado em uma incubadora artificial (B.O.D - 342L[®]) na Sala de Cultivo de Plâncton do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA. Em recipientes plásticos (14cmx10cmx11cm), foi adicionado substrato para incubação (vermiculita) umedecido na concentração de 1:1 (1l d'água para 1kg de vermiculita); posteriormente, os ovos foram distribuídos de forma aleatória nos recipientes, que comportavam de 6 a 7 ovos cada. A vermiculita foi utilizada como substrato de incubação por apresentar elevado poder de retenção hídrica, mantendo por muito mais tempo a umidade local (Guimarães et al., 2017), e por sua eficácia técnica no âmbito da incubação artificial de ovos de outros répteis (Durval et al., 2016; Paz et al., 2016).

A temperatura usada para a incubação dos ovos foi de 32°C, descrita por Souza e Vogt (1994) como a temperatura pivotal da espécie, ou seja, temperatura que possibilita o desenvolvimento de 50% de chance dos embriões serem machos e 50%, fêmeas. Porém, durante todo o período de incubação, foram registrados de hora em hora os dados da temperatura interna da incubadora por meio de sensor remoto de temperatura Hobo data logger (Onset[™] Computer Corporation), para avaliar as possíveis variações de temperatura durante o experimento. Para manter a umidade no interior da incubadora, foram utilizadas quatro placas de Petri abastecidas com água. O controle de umidade foi feito por um higrômetro interno e, quando necessário, realizava-se a pulverização de água sobre o substrato em que os ovos estavam sendo incubados, além do reabastecimento constante das quatro placas de Petri com água.

Processamento e análises histológicas

A partir do 4º dia de incubação até o momento da eclosão (60º dia), foram coletados dois ovos diariamente da incubadora. Com auxílio de tesoura cirúrgica, os embriões foram retirados dos ovos e induzidos à morte seguindo o protocolo: embriões até o 17º dia de incubação, por submersão em Cloridrato de Lidocaína (2%) e, posteriormente, conforme o crescimento do embrião, volumes entre 0,5ml e 2ml do mesmo anestésico foram administrados por injeção via intraperitoneal (Magalhães et al., 2017). O processamento só era iniciado a partir da certeza de que o embrião já estava morto. Os embriões foram dissecados submersos em solução salina 7,5%, no entanto, somente embriões com mais de 17 dias de incubação puderam ser dissecados. Para descrição macroscópica do desenvolvimento e diferenciação gonadal foi realizada documentação fotográfica macroscópica com auxílio de estereomicroscópio Zeiss (Stemi SV 11) com câmera AxioCamICc 5 acoplada. Todo o processamento foi realizado no Laboratório Temático de Microscopia Eletrônica e Nanotecnologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Embriões de até 16 dias de incubação foram fixados inteiros em solução de Bouin; entre 17 e 29 dias de incubação, foi removido o plastrão, ficando exposto o aparelho urogenital e, em seguida, os embriões foram fixados em boiun; após 30 dias, o complexo gônada-mesonefro foi removido e fixado separadamente em bouin. Passadas 12 horas, as amostras foram lavadas em água corrente e armazenadas em álcool 70% até o processamento histológico.

Para a microscopia de luz, as amostras passaram pelo processamento histológico seguindo o protocolo de Magalhães (2017): desidratação em série gradual de etanol (80%, 90%, 95% por 15 min. cada e 100% [2x] por 10 min. cada), diafanizados em 3 banhos de Xilol por 5 min. cada, e incluídos em paraplast por 1h e 30min. Após isso, foram feitos cortes seriados em 4µm, as lâminas preparadas foram submetidas à técnica de coloração por Hematoxilina-Eosina – HE e imagens das lâminas foram obtidas em microscópio de luz Zeiss, modelo *Axioplan2* acoplado à câmera *AxioCam MRC* em diferentes aumentos.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Amostras de gônadas foram separadas e fixadas em solução de Glutaraldeído 2,5% para microscopia eletrônica de transmissão (MET). As amostras foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 100m, pH 7,2 (3x por 10 min. cada). Em seguida, foi realizada uma pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão durante 2h, seguido de 3 lavagens em tampão cacodilato de sódio durante 10 min. cada. Posteriormente, fez-se contrastação *in bloco* com acetato de uranila aquosa a 5%, overnight a 4°C, seguido por desidratação em séries de etanol graduado de 50%, 70%, 90%, 95%, 100% (2x) durante 10 min. e óxido de propileno (2x) durante 15 min. cada. As amostras foram incorporadas em concentrações crescentes de resina Durcupan-ACM Fluka © a 4°C durante 4 dias e polimerizadas a 60°C durante 72h. Secções ultrafinas de 70nm 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 min., seguido por citrato de chumbo a 0,5% durante 10 min. e visualizadas sobre microscópio MEV VEJA 3 – Tescan (Magalhães, 2017).

Resultados

Análise Macroscópica

A incubação dos ovos durou 60 dias, com temperatura média de $31,8 \pm 0,8^\circ\text{C}$ ($31,1^\circ\text{C}$ - $32,1^\circ\text{C}$) e umidade $97,1 \pm 3,3\%$ (83% - 99%), e foram analisados embriões a partir do 4º dia de incubação. Macroscopicamente, entre o 17º e 18º dias de incubação foi possível observar o início da formação gonadal, que possuía coloração esbranquiçada pouco perceptível, localizada aproximadamente no terço médio da região ventromedial do mesonefro (que, nessa fase do desenvolvimento embrionário, ocupou quase toda a extensão do embrião), porém não foi possível identificar uma separação entre o mesonefro e a gônada (Fig. 1A). A partir do 19º dia do desenvolvimento, uma leve diferenciação entre o mesonefro e a gônada já foi identificada (Fig. 1B), no entanto, tornou-se claramente evidente no 22º dia de incubação, quando também se observou seu formato fusiforme. Entre o 24º e 30º dias a gônada apresentou maior largura, enquanto que o mesonefro diminuiu de volume em relação ao corpo do embrião (Fig. 1C; 1D; 1E). Do 32º ao 55º, o mesonefro foi regredindo em volume e se tornando estreito, enquanto que, no mesmo período a gônada tornou-se mais espessa e aumentou o comprimento em relação ao mesonefro, ocupando quase que a totalidade do espaço que antes era apenas mesonefro (Fig. 1F; 1G). Entre o 56º e 60º dias de incubação, a gônada estava diferenciada e permaneceu localizada na região ventromedial do mesonefro, ocupando um espaço desde o início ao final do comprimento do mesonefro (Fig. 1H).

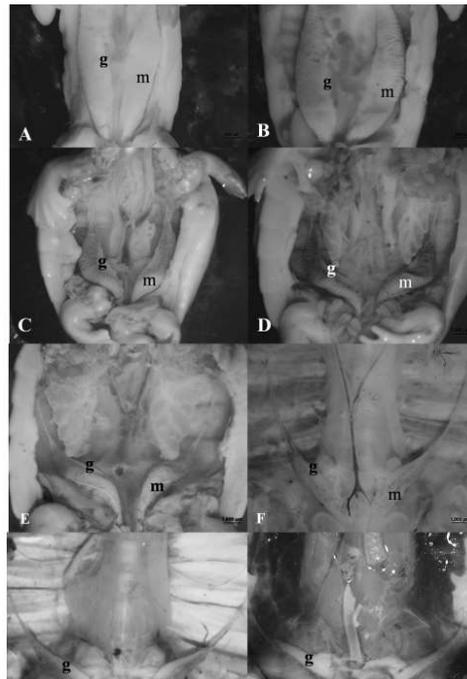


Figura 1. Gônada durante o desenvolvimento embrionário em *P. unifilis*. A- 17 dias de incubação; B- 20 dias de incubação; C- 24 dias de incubação; D- 27 dias de incubação; E- 30 dias de incubação; F- 33 dias de incubação; G- 40 dias de incubação; H- 58 dias de incubação. *m*: mesonefro, *g*: gônada,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

Análise Microscópica

Os achados microscópicos permitiram dividir o desenvolvimento gonadal em três etapas: migração das células germinativas primordiais, estabelecimento da gônada indiferenciada e diferenciação gonadal, conforme descrição abaixo.

Migração das células germinativas primordiais

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

A partir do 14º dia de incubação, na região ventromedial do mesonefro, foi observada a proliferação das células germinativas que estavam distribuídas em mais de uma camada, além do aumento das células do estroma gonadal (Fig. 2G; 2H).

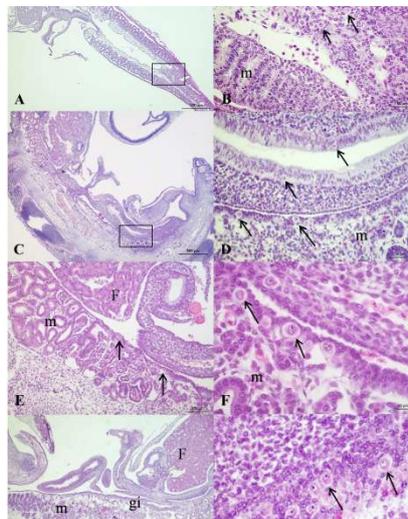


Figura 2. Fotomicrografia de gônadas em diferentes dias de desenvolvimento. A- 7º dia do desenvolvimento; B- Aumento da área retangular da figura 2A mostrando a área onde as células germinativas primordiais estão localizadas no início do desenvolvimento; C- 9º dia do desenvolvimento; D- Aumento da área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

Estabelecimento da gônada indiferenciada

No 14º dia de incubação, foi visível o aumento da espessura da gônada devido à proliferação das células somáticas e CGP, sendo que as CGP estavam distribuídas em mais de uma camada. Dessa forma, ocorreu o estabelecimento da gônada indiferenciada na região ventromedial do mesonefro. Nos dias que se seguiram, houve um aumento da espessura da gônada pela presença do estroma altamente celularizado formado por tecido conjuntivo (Fig. 2G).

A partir do 19º dia de incubação, duas regiões da gônada indiferenciada se tornaram distintas: a camada cortical externa com as CGP's distribuídas preferencialmente ao longo do córtex; e a medula interna na qual os cordões sexuais primitivos foram identificados (Fig. 3B; 3C). As células dos cordões sexuais foram caracterizadas por apresentarem núcleos pequenos e fortemente corados (Fig. 3C). O epitélio germinativo apresentou-se simples cúbico e, com 21 dias de incubação, invaginações do epitélio começaram a ser identificadas (Fig. 3D). Foram observadas células oriundas do mesonefro penetrando no estroma germinativo para auxiliar na formação dos cordões sexuais primitivos (22º dia) (Fig. 3E).

No decorrer do desenvolvimento, a gônada tornou-se mais espessa pela proliferação das CGP's e várias camadas de células germinativas foram identificadas no córtex (25º dia) (Fig. 3F). A partir do 25º dia de incubação, foi observado aumento das células do estroma e de tecido conjuntivo frouxo entre os

cordões sexuais, que ao longo do desenvolvimento apresentou um aumento expressivo. Com 28 dias, os cordões sexuais estavam bem organizados e suas células ficaram mais visíveis pela presença de núcleos fortemente corados. Além disso, foi possível observar a presença de muito tecido conjuntivo mesenquimal entre eles, deixando os cordões ainda mais em evidência (Fig. 3G; 3H). No decorrer do desenvolvimento, o pregueamento do epitélio germinativo diminuiu e foi revestido por epitélio cúbico simples (Fig. 3H).

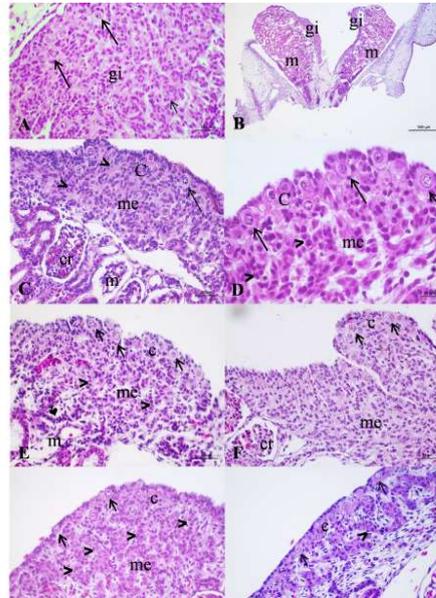


Figura 3. Fotomicrografia de gônadas indiferenciadas em diferentes dias de desenvolvimento. A- 19º dia do desenvolvimento; B- 20º dia do desenvolvimento; C- 20º dia do desenvolvimento; D- 21º dia do desenvolvimento; E- 22º dia de desenvolvimento; F- 25º dia do desenvolvimento; G- 28º dia do desenvolvimento;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

Diferenciação gonadal

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

A organização tubular dos cordões sexuais se tornou mais evidente a partir do dia 38 de incubação e os túbulos seminíferos foram caracterizados mais claramente. Foi identificada uma grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo e células mesenquimais entre os túbulos seminíferos, deixando-os bem espaçados entre si (Fig. 4C). A partir do 39º dia, uma lâmina basal ficou levemente visível contornando os túbulos seminíferos (Fig. 4D; 4E). E com 45 dias, essa lâmina basal foi claramente identificada; células pavimentosas com características de células mioides também foram observadas associadas à lâmina basal (Fig. 4F). Com 51 dias, os túbulos seminíferos ficaram mais organizados, no entanto, as células germinativas ainda eram visíveis nos túbulos, auxiliando na sua formação (Fig. 4G), sendo observadas até nos indivíduos recém-eclodidos (60º dia) (Fig. 4H). Nos indivíduos recém-eclodidos, o testículo foi revestido por epitélio cúbico simples sem pregueamento, e apresentou túbulos seminíferos formados, embora ainda fosse possível identificar o processo de diferenciação ocorrendo (Fig. 4H). Não conseguimos identificar células de sertoli nos túbulos seminíferos, nem células de Leydig no tecido conjuntivo intersticial.

Ultraestrutura testicular

Foram microfotografados e analisados os testículos do 39° dia e do 47° dia de incubação. Os túbulos seminíferos estavam formados, e um lúmen foi visualizado no centro do túbulo. No 39° dia do desenvolvimento, foi identificado o início da formação da lâmina basal (Fig. 5A; 5B; 5C), e com 47 dias, essa lâmina basal ficou mais evidenciada. Células achatadas com características de células mioides foram identificadas, associadas à lâmina basal (Fig. 5C). No tecido conjuntivo intersticial, foram observadas células com características de células endócrinas com vesículas lipídicas eletrodensas em seu interior (Fig. 5D).

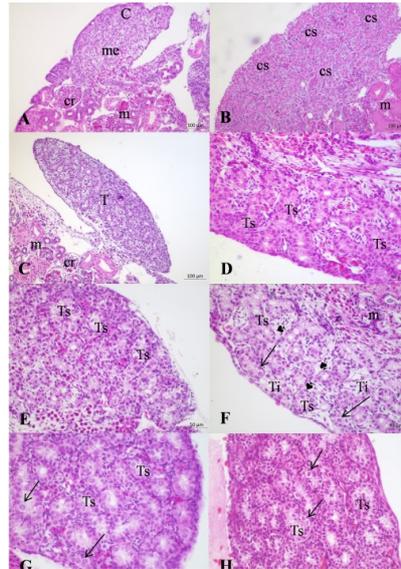


Figura 4. Fotomicrografia de gônadas em diferenciação para testículo. A- 35° dia do desenvolvimento; B- 36° dia do desenvolvimento; C- 38° dia do desenvolvimento; D- 39° dia do desenvolvimento; E- 42° dia de desenvolvimento; F- 45° dia do desenvolvimento; G- 51° dia do desenvolvimento; H- 60° dia do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

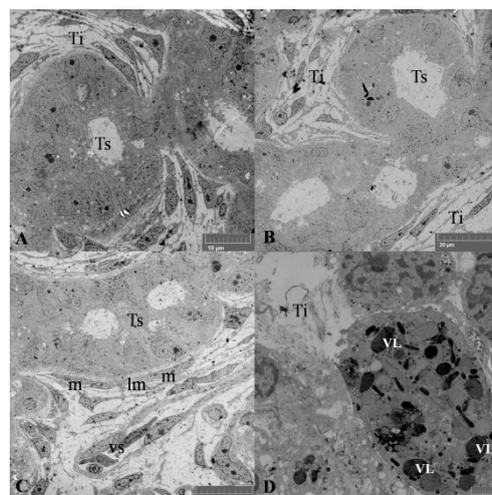


Figura 5. Eletromicrografia de testículo. A, B, C- 39° dia de incubação. Túbulo seminífero em diferenciação; D- 47° dias de incubação. Célula com característica endócrina. *Ts*: túbulo seminífero, *Ti*: tecido intersticial, *lm*: lamina basal, *m*: células mioides, *Vs*: vaso sanguíneo, *VL*: vesícula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



Discussão

No presente estudo, a descrição do desenvolvimento gonadal de *Podocnemis unifilis* foi realizada com temperatura controlada, em média de $31,8^{\circ}\pm 0,8^{\circ}\text{C}$, e foi dividida em três etapas: migração das células germinativas primordiais, estabelecimento da gônada indiferenciada e da diferenciação gonadal. A mesma caracterização foi feita para *Sternotherus odoratus* (Risley, 1933), *Anolis carolinensis* (Forbes, 1956), *Lepidochelys olivacea* (Merchant-Larios et al., 1989), *P. expansa* (Hildebrand et al., 1997; Magalhães, 2017).

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

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

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

Para *P. unifilis*, as CGP's se estabeleceram na região ventromedial do mesonefro por volta do 14º dia de incubação, dando início à formação da gônada indiferenciada. Característica também descrita para *P. expansa* (Magalhães, 2017). Para *S. odoratus*, o início da gonadogênese deu-se por uma rápida proliferação do epitélio germinal na superfície ventromedial do mesonefro para formar a crista germinal (Risley, 1933), o que foi evidenciado também para *P. unifilis*. Em *P. unifilis*, observou-se que na gônada indiferenciada duas regiões foram definidas: a região cortical externa, caracterizada pela presença das CGP's; e a região medular interna, na qual os cordões sexuais são encontrados. Essa característica também foi descrita para *P. expansa* (Hildebrand et al., 1997; Magalhães, 2017) e para outras espécies de répteis (Risley, 1933; Pieau et al., 1999). Durante esse período da gônada indiferenciada para *P. unifilis*, células em migração oriundas do mesonefro para a região medular foram observadas. Essa migração celular também foi descrita para *P. expansa* (Magalhães, 2017). Células que proliferam a partir da cápsula de Bowman e do epitélio celômico dão origem a cordões retilíneos (rete cords) e poderiam contribuir de forma limitada para a edificação de cordões medulares testiculares e ovarianos (Pieau et al., 1999).

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

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

Ocorreu uma organização dos cordões medulares (a partir do 35º dia de incubação) até estarem



na disposição final típica dos túbulos seminíferos, e as células germinativas presentes no epitélio germinativo migraram entre as células epiteliais dos cordões medulares para auxiliar na formação dos túbulos seminíferos. Os primórdios dos túbulos seminíferos passaram a ser contornados por uma lâmina basal com células mioides associadas (Smith e Joss, 1993).

No presente estudo, CGP's foram identificadas auxiliando na formação dos túbulos seminíferos até em indivíduos recém eclodidos. Característica destacada em outros estudos (Risley, 1933; Hildebrand et al., 1997; Pieau et al., 1999; Magalhães, 2017). A presença de CGP em testículos de recém-eclodidos demonstra que sua diferenciação continua mesmo após a eclosão. Em nossos achados, foi observado que mesmo sendo incubados na mesma temperatura, alguns indivíduos se diferenciam em tempos diferentes, ou seja, indivíduos com mais dias de incubação em alguns casos estavam menos diferenciados que indivíduos com menos dias de incubação.

Apesar do trabalho de Souza e Vogt (1994) estimar para *P. unifilis* a temperatura pivotal de 32°C, temperatura que determina uma razão sexual de 1:1, neste estudo a gônada de todos os indivíduos analisados se diferenciou em testículo. Portanto, foi observado que a temperatura de 31,8°C, mesmo sendo próxima da temperatura pivotal descrita, gerou apenas machos. Quando o desenvolvimento embrionário ocorre em temperaturas próximas à pivotal, pequenas diferenças de 1°C a 2°C são suficientes para alterar a razão sexual dos embriões (Yntema e Mrosovsky, 1982). A amplitude da zona de transição da temperatura, em que machos e fêmeas são gerados, é muito variável, como nas tartarugas marinhas *Natator depressus* e *Dermochelys coriacea* (Hewavisenithi e Parmenter, 2000), que é de menos de 1°C, já para *Chelonia mydas* fica em torno de 4 °C (Mrosovsky et al., 1984).

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

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

Conclusões

As etapas de diferenciação gonadal foram semelhantes a outras espécies de quelônios com determinação dependente da temperatura de incubação, no entanto, não foi possível descrever como ocorre a diferenciação da gônada em ovário para esta espécie. Embora o desenvolvimento tenha sido em ambiente onde foi possível controlar temperatura e umidade, não se sabe se outros fatores podem ter influenciado nos resultados obtidos. Portanto, não se tem uma explicação concreta para o fato de somente indivíduos machos terem sido encontrados no presente estudo, o que resulta na necessidade de realizar mais estudos com diferentes condições de incubação para compreender os mecanismos de determinação do sexo em *Podocnemis unifilis*.

Agradecimentos

Agradecemos ao pesquisador Dr. Richard C. Vogt (*In memoriam*) por sua contribuição neste estudo e pelos anos dedicados à pesquisa com quelônios amazônicos. Ao Projeto Pé-de-pincha, coordenado pelo Dr. Paulo Cesar Machado Andrade, agradecemos pelo apoio na realização da pesquisa, possibilitando a coleta dos ovos de tracajá. Ao Laboratório Temático de Microscopia Eletrônica e Nanotecnologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), agradecemos pelo suporte no processamento e análise em Microscopia de luz e Microscopia eletrônica de transmissão.

Referências

Andrade PCM. Manejo Comunitário de Quelônios – Projeto Pé-de-Pinha. Manaus: Gráfica Moderna,



1ª ed., 2015.

Bull JJ. Sex determination in reptiles. *Quart Ver Biol*, v. 55, p.3-21, 1980.

Bull JJ, Vogt RC. Temperature-sensitive periods of sex determination in Emydid turtles. *Jour Exper Zool*, v.218, p.435-440, 1981.

Bull JJ, Charnov EL. Enigmatic reptilian sex ratios. *Evolution*, v.43, p.1561-1566, 1989.

Charnov EL, Bull JJ. When is sex environmentally determined? *Nature*, v.266, p.828-830, 1977.

Conover DO, Van Voorhees DA, Ehtisham A. Sex ratio selection and evolution of environmental sex determination in laboratory populations of *Menidia menidia*. *Evolut*, v.46, p.1722-1730, 1992.

Durval MC, Carneiro IGA, Santos ALQ. Eficiência da técnica de incubação artificial de ovos de *Trachemy ssp* (Testudines, Emydidae) incubados no substrato vermiculita. *In: VIII Encontro sobre Animais Selvagens*. Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, p.86-88, 2016

Ferreira-Junior PD. Influência dos processos sedimentológicos e geomorfológicos na escolha das áreas de nidificação de *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-amazônia) e *Podocnemis unifilis* (tracajá) na bacia do Rio Araguaia. 296f, 2003. Tese (Doutorado, Departamento de Geologia). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

Ferreira-Junior, P.D. Aspectos Ecológicos da Determinação Sexual em Tartarugas. *Acta Amazon*, v. 39, p.139-154, 2009.

Forbes, T.R. The development of thereproductive system of a lizard, *Anolis carolinensis*. *Amer Jour Anat*, v.98, p.139-158, 1956.

Fujimoto T, Ukeshima A, Miyayama Y, Horio F, Ninomiya E. Observations of primordial germ cells in the turtle embryo (*caretta caretta*): light and electron microscopic studies. *Develop Growth and Differ*, v. 21, p.3-10, 1979.

Guimarães CDO, Silva ASL, Palha MD. Incubação de ovos e desenvolvimento pós-natal de *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) (Testudines, Kinosternidae) em cativeiro. *Pubvet*, v.11, p.1285-1292, 2017.

Hewavisenthi S, Parmenter JC. Hydric environment and sex determination in the flatback turtle (*Natator depressus Garman*) (Chelonia: *Cheloniidae*). *Aust J Zool*, v.48, p.653-659, 2000.

Hildebrand PV, Bermudez N, Peñuela MC. La Tortuga Charapa (*Podocnemis expansa*) em el bajo rio Caqueta Amazonas, Colombia: Aspectos de la Biología reproductiva y Tecnicas para su manejo. Colombia: Disloque Editora. 1ª ed.,1997.

Magalhães MS. Desenvolvimento embrionário de *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae): descrição do pronefro e mesonefro e diferenciação gonadal em ambiente natural, Balbina, Amazonas. 150f, 2017. Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus-AM.

Magalhães MS, Vogt RC, Sebben A, Dias LC, Oliveira MF, Moura CEB. Embryonic development of the Giant South American River Turtle, *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae). *Zoomorphology*, v.136, p.523-537, 2017.

Merchant-Larios H, Fierro IV, Urruiza BC. Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpeto Monog*, v.3, p.43-61, 1989.

Miller D, Summers J, Silber S. Environmental versus genetic sex determination: a possible factor in dinosaur extinction. *Fertil and Steril*, v.81, p954-964, 2004.

Mrosovsky N, Dutton PH, Whitmore CP. Sex ratio of two species of sea turtle nesting in Suriname. *Can Jour Zool*, v.62, p.2227-2239, 1984.

Mrosovsky N. Sex ratios of sea turtles. *Jour Exper Zool*, v.270, p.16-27, 1994.

Naro-Maciel E, Mrosovsky N, Marcovaldi MA. Thermal profiles of sea turtle hatcheries and nesting areas at Praia do Forte, Brazil. *Chel Conserv Biol*, v.3, p.407-413, 1999.

Paz BF, Souza LCGM, Valdes SAC, Fernandes EA, Santos ALQ. Avaliação de proteína, extrato etéreo e matéria mineral do conteúdo de ovos de *Caiman crocodilus crocodilus* Linnaeus, 1758 (Crocodylia, Alligatoridae). *In: VIII Encontro sobre Animais Selvagens*. Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, p.25-29, 2016.

Pieau C. Differentiation du sexe en fonction de la temperature chez les embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chelonien): effets des hormones sexuelles. *Ann Embryol Morphog*, v.7, p.365-394, 1974.

Pieau C, Dorizzi M, Richard-Mercier N. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cell Mol Life Sci*, v.55, p.887-900, 1999.

Risley PL. Contributions on the development of the reproductive system in the musk turtle, *Sternotherus odoratus* (Latreille) II. Gonadogenesis and sex differentiation. *Zeitschr. Zellfor Mikr Anat*, v.18, p.493-543, 1933.



Rhen T, Fagerlie R, Schroeder A, Crossley DA, Lang JW. Molecular and morphological differentiation of tests and ovaries in relation to the thermo sensitive period of gonad development in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Different*, v.89, p.31-41, 2015.

Souza RR, Vogt RC. Incubation temperature influences sex and hatchling size in the Neotropical turtle *Podocnemis unifilis*. *Jour of Herpeto*, v.28, p.453-464, 1994.

Smith CA, Joss JMP. Gonadal sex differentiation in *Alligator mississippiensis*, a species with temperature dependent sex determination. *Cell Tiss Res*, v. 273, p.149-162, 1993.

Yntema CL, Mrosovsky N. Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead turtles. *Can Jour of Zool*, v.60, p.1012-1016, 1982.

Vogt RC. Temperature controlled sex determination as a tool for turtle conservation. *Chel Cons and Biol*, v.1, p.159-162, 1994.
