



Programa de Pós-Graduação em
Ecologia

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA**

**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**

Sarah da Silva Mendes

Juiz de Fora

2017

Sarah da Silva Mendes

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

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Bernadete Maria de Sousa

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Christina Marques Nogueira Castañon

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mendes, Sarah da Silva.

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 / Sarah da Silva Mendes. - 2017.

67 f. : il.

Orientadora: Bernadete Maria de Sousa

Coorientadora: Maria Christina Marques Nogueira Castañon

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, 2017.

1. dimorfismo sexual. 2. morfologia. 3. morfometria geométrica. 4. tartaruga cabeçuda. I. de Sousa, Bernadete Maria, orient. II. Castañon, Maria Christina Marques Nogueira, coorient. III. Título.

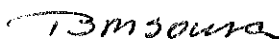
“MORFOMETRIA GEOMÉTRICA E HISTOLOGIA: FERRAMENTAS COMPLEMENTARES NA ESTIMATIVA DO SEXO DE FILHOTES DA TARTARUGA MARINHA CARETTA CARETTA (LINNAEUS, 1758) (CHELONIDAE, TESTUDINES) DOS ESTADOS DA BAHIA E DO ESPÍRITO SANTO). ”

Sarah da Silva Mendes

Orientadora: Profa. Dra. Bernadete Maria de Sousa

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

Aprovado em 21 de fevereiro de 2017.



Profa. Dra. Bernadete Maria de Sousa
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF



Profa. Dra. Maria Christina Marques Nogueira Castanon
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF



Prof. Dr. Oscar Rocha Barbosa
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ



Profa. Dra. Aparecida Alves do Nascimento
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ



Profa. Dra. Iara Alves Novelli
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

*Aos meus queridos amigos e parceiros
do Laboratório de Répteis da UFJF!
Obrigada pelos momentos
compartilhados! Esse título também é
de vocês!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por essa oportunidade que me foi dada, de crescer profissionalmente trabalhando com os animais mais fascinantes! Por toda a generosidade, ao colocar pessoas tão maravilhosas cruzando o meu caminho!

Às tartarugas, seres maravilhosos, que me surpreendem a cada dia que aprendo algo a mais sobre elas!

Francisco de Paula Mendes Filho e Aguida Inês da Silva Mendes, meus pais amados, obrigada por tudo! Pelo carinho, incentivo, compreensão! Mãe, minha melhor companhia, sempre presente, me amparando, apoiando e torcendo por mim!! Pai, maior torcedor e incentivador, comemorando cada vitória e conquista sempre muito orgulhoso! Amo muito vocês!!!

Marcela da Silva Mendes, minha linda irmã e meu porto seguro! Obrigada por ser meu exemplo de pessoa batalhadora, dedicada e perseverante! Pelas palavras de apoio, pelos incontáveis conselhos e abraços nos momentos em que eu mais precisava! Te amo!

Miguel, meu sobrinho amado! Você nem nasceu e enche meu coração de amor e expectativa! Já me inspira a ser uma pessoa melhor!

À professora Bernadete Maria de Sousa, muito obrigada pela atenção, orientação e conversas sempre muito agradáveis. Pelo seu estado de ânimo sempre calmo e sereno, que de certa forma me contagiava e me acalmava sempre que eu estava ansiosa! Ou seja, sempre!! Obrigada por tornar possível a realização desse sonho!

À professora Maria Christina Marques Nogueira Castañon, uma apaixonada pelo conhecimento! Obrigada pela dedicação em me orientar, em me ensinar histologia e em identificar os tecidos! Pelas conversas na cantina e pela amizade! Obrigada por tudo!

À FAPEMIG, pela bolsa, que me permitiu dedicação exclusiva na elaboração desse trabalho e pelo financiamento do meu projeto, possibilitando a compra de materiais que irão beneficiar a todos os estudantes da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia por me fornecer todo o suporte físico e todo o amparo necessários para a elaboração desse projeto.

À secretaria da Pós-Graduação em Ecologia, pela ajuda com toda a parte burocrática e disposição em ajudar sempre.

Gabriane Nascimento Porcino e Wanessa de Paula Martins, minhas queridas amigas, obrigada pelos incentivos, pela preocupação por me incentivarem e serem tão presentes em minha vida.

Ao João Abreu, Jonathas Barreto e todos os colegas do Projeto TAMAR, tanto da Bahia quanto do Espírito Santo, pela ajuda, recepção calorosa e conversas relaxantes. Por

cederem parte do seu espaço para que eu pudesse executar a coleta do material. Muito obrigada!

À Iara Alves Novelli, pelas sugestões, conversas, risadas, conselhos e pela disponibilização de materiais muito úteis nesse trabalho.

Robson Henrique de Carvalho, meu querido amigo e parceiro de trabalho, outro apaixonado pelas tartarugas, obrigada pelo incentivo quando eu ficava meio desanimada, sempre me instigando a fazer o meu melhor! Obrigada!

André Yves Barboza Martins, Lúcio Moreira Campos Lima e Pilar Cozendey Silva, parceiros de todas as horas! Obrigada pela amizade, companheirismo e pelos momentos, sempre tão divertidos, que passamos juntos!!

Paola Rosa de Oliveira, obrigada pela ajuda de sempre na histologia! Pelos momentos compartilhados, experiências trocadas e pelo convívio!!!

Larissa Cardoso Barbosa, Caroline Nogueira Aguiar, Matheus Nehrer Rodrigues, Isabele Araújo Granato e Isadora Travnik Castro, obrigada por toda a ajuda, especialmente na elaboração das lâminas histológicas!! Nossas tardes juntos eram sempre muito divertidas e rendiam várias gargalhadas! E muitas lâminas também! Vocês foram essenciais para que esse projeto se tornasse realidade!

Aos meus queridos parceiros de laboratório! Obrigada pelos anos que dividimos, pelas risadas e estímulos nos momentos de tensão!

Leandro dos Santos Lima Hohl, obrigada pelo socorro sempre que precisei! Pelas dicas valiosas!

Ao Adalto Regino da Silva, pela ajuda com a coloração de algumas lâminas e pela paciência e me ensinar parte de seu conhecimento! Muito obrigada.

À Lúcia Mara Januário dos Anjos, pela ajuda e disponibilização do laboratório de histologia, do departamento de Morfologia, da UFJF. Obrigada pela ajuda nas colorações especiais e pelos ensinamentos sobre a rotina de um laboratório de histologia.

A todos os estagiários do Projeto TAMAR, obrigada pela ajuda nas coletas dos exemplares e por tornarem meu trabalho mais divertido e prazeroso.

A todos os amigos e familiares, por compreenderem minha ausência e torcerem pelo meu sucesso!

Ao Projeto TAMAR ICMBio, que disponibilizou o sua Base em Sítio do Conde e em Regência para a realização das partes práticas e pelo acesso a alguns dados técnicos.

Ao SISBIO, pela concessão da licença para a coleta de dados e manuseio dos exemplares.

RESUMO

Os filhotes e juvenis de quelônios não apresentam anatomicamente características sexuais secundárias visíveis, não sendo possível diferenciar o sexo através da observação da carapaça. Vários autores defendem a análise histológica como a melhor técnica para se realizar a sexagem de filhotes da espécie *Caretta caretta*. Os objetivos do presente trabalho foram realizar a identificação sexual de filhotes de *C. caretta* através da morfometria geométrica da carapaça e plastrão e da histomorfologia, além de verificar se há diferença entre as populações dos estados do Espírito Santo e da Bahia com base na morfometria geométrica da carapaça e plastrão. Foram utilizados 204 filhotes natimortos, coletados em diversos ninhos ao longo da praia de Sítio do Conde, Conde, Bahia, e de Regência Augusta, Linhares, Espírito Santo, ambas localizadas no Brasil. Para a análise morfométrica, cada animal teve a carapaça e o plastrão fotografados e os softwares TPSUtil, TPSDig2 e MorphoJ foram utilizados para a realização das análises pertinentes. Posicionados em decúbito dorsal, os espécimes foram ressecados e o plastrão e vísceras foram removidos para permitir a visualização das gônadas e rins, que depois de fotografados foram armazenados em formalina 10% tamponada. Posteriormente foram submetidos à técnica histológica convencional. Verificou-se uma razão sexual favorável às fêmeas. A análise de componentes principais não apontou diferença na carapaça e plastrão de machos e fêmeas das duas localidades. Apenas a análise de função discriminante revelou que há diferença entre a carapaça e plastrão dos espécimes das diferentes localidades. As gônadas estavam localizadas próximas ao hilo renal, com formato filiforme. Nos ovários foi possível observar o córtex constituído por epitélio cúbico simples ou estratificado bem desenvolvido envolvendo a medula desorganizada e rica em matriz intersticial. O córtex dos testículos era composto por um epitélio pavimentoso simples, medula muito bem desenvolvida e com pouca matriz intersticial, observando-se vários túbulos seminíferos. Trabalhos realizados com filhotes de tartaruga cabeçuda e outras espécies de quelônios, utilizando a morfometria geométrica, também demonstraram haver diferenças na carapaça e no plastrão que distinguem o sexo de filhotes recém nascidos. As características histológicas identificadas foram semelhantes às encontradas por outros autores. Outros trabalhos defendem que a análise macroscópica é suficiente para identificar o sexo de filhotes de tartarugas, o que foi demonstrado efetivamente para *Dermochelys coriacea* e *Chelonia mydas*, mas não foi efetivo para *C. caretta*. A

morfometria geométrica se mostrou uma ferramenta promissora cuja análise pôde, conforme nosso estudo, corroborar a existência de duas sub-populações que ocorrem no litoral brasileiro.

Palavras-Chave: dimorfismo sexual, morfologia, morfometria geométrica, tartaruga cabeçuda

ABSTRACT

The hatchlings and juvenile turtles have not anatomically visible secondary sex characteristics, so it is not possible to differentiate sex by viewing the carapace. Several authors advocate histological analysis as the best technique for performing sex of the *Caretta caretta* hatchlings. The aims of this study were to identify sex of hatchling *C. caretta* by geometric morphometrics of carapace and plastron and histomorphology and analyze if are difference between populations from Espírito Santo and Bahia by geometric morphometric of carapace and plastron. 204 stillborn hatchlings were collected in different nests along the Sítio do Conde' Beach, Conde, Bahia and Regência Augusta' Beach, Espírito Santo, both located in Brazil. For morphometric analysis each animal had photographed the shell and plastron and we used the software TPSUtil, TPSDig2, and MorphoJ for morphometrics analysis. The specimens were positioned and removed the plastron and some viscera to allow visualization of the kidneys and gonads, photographed after they were stored in 10% buffered formalin. The histological analysis followed the steps of conventional histological technique. Principal Components Analyzes do not reveals difference in carapace and plastron between females and males. Just discriminant function reveals there are differences between two localities. The sex ratio was female bias in both localities. The gonads were located near the renal hilum, with threadlike format. Ovarian cortex was possible to observe a well-developed cuboidal epithelium, associated with a disorganized medulla and interstitial-rich matrix. The cortex of the testes was composed of a thin layer of simple squamous epithelium, a very well-developed medulla and low interstitial matrix, observing several seminiferous tubules clearly distinguishable. Work done with hatchling loggerhead turtles and other species also showed significant differences in the carapace that distinguish the sex of young turtles. The histological features were similar to those identified by other authors, some argue that the macroscopic analysis is sufficient to identify the sex of hatchlings, which has been shown to effectively *Dermochelys coriacea* and *Chelonia mydas*, but was not effective in *C. caretta*. Hormonal measurements were also satisfactory to sex in order to young *C. mydas*, but authors disagree on this method to other species. Geometric morphometrics proved to be a promising tool whose analysis could, according to our study, corroborate the existence of two subpopulations that occur in the Brazilian coast.

Keys-Word: geometric morphometrics, loggerhead turtle, morphology, sexual dimorphism

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotografias das tartarugas que ocorrem no Brasil: A- Tartaruga verde; B- Tartaruga oliva; C- Tartaruga de pente; D- Tartaruga gigante; E- Tartaruga cabeçuda. Fotos: Sarah da Silva Mendes (A, C, D e E) e Reptile Database (B).....18
- Figura 2.** Tartarugas que não ocorrem no Brasil: A- *Natator depressus*; B- *Lepidochelys kempii*. Fonte: Reptile Database.....19
- Figura 3** Fotografia de uma fêmea de *Caretta caretta* desovando em Regência (ES). Foto: Sarah da Silva Mendes.....21
- Figura 4.** Fotografia de filhote recém eclodido de *Caretta caretta*. Foto: Sarah da Silva Mendes.....22
- Figura 5.** Modelo conceitual da distribuição de tartarugas cabeçudas por estágio de vida e hábitat, conforme proposto por TEWG (2009). O azul mais escuro representa os estágios I e II, ou o estágio mais tradicional da vida oceânica precoce, no qual as tartarugas ocupam exclusivamente os habitats oceânicos após a transição da praia para as águas neríticas. O azul representa os estágios juvenis III e IV, no qual os animais ocupam tanto habitats neríticos e oceânicos. E o azul mais claro representa os adultos que ocupam habitats oceânicos, neríticos e terrestres (esse último apenas para fêmeas). Essa distribuição de tamanho foi derivada de populações atlânticas e não necessariamente refletem as populações globais. Adaptado de Mansfield & Putman, (2013).....22
- Figura 6.** Esquema do sistema urogenital de tartarugas. Adaptado de Wyneken (2001).....24
- Figura 7.** Fotografia mostrando a abertura de ninho e coleta dos natimortos de *Caretta caretta* em Sítio do Conde (BA). Foto: João Abreu.....28
- Figura 8.** Fotografia de um dos monoblocos amostrados, contendo as gônadas (destacadas pelas setas) e os rins, representados pela letra R. Foto: Sarah da Silva Mendes.....29
- Figura 9.** Fotografia evidenciando as *landmarks* registradas na carapaça de filhote de *Caretta caretta*.....31
- Figura 10.** Fotografia evidenciando as *landmarks* registradas no plastrão de filhote de *Caretta caretta*.....32
- Figura 11.** Fotografia, em vista ventral da cavidade peritoneal de *Caretta caretta*, destacando-se: 1: traquéia; 2: coração; 3: estômago; 4: fígado; 5: rim; 6: gônada. Foto: Sarah da Silva Mendes.....34
- Figura 12.** Fotomicrografia, em corte longitudinal, do testículo de *Caretta caretta*. Em A, observa-se o testículo de um espécime coletado na Bahia e em B o de um exemplar do Espírito Santo. Em ambas as imagens destaca-se o córtex com epitélio pavimentoso simples (setas), medula bem desenvolvida, com destaque para os túbulos seminíferos (a). (A-H&E 200X); (B-H&E 200X).....35

Figura 13. Fotomicrografia, em corte longitudinal, do ovário de *Caretta caretta*. Em A observa-se a gônada de um espécime da Bahia e em B de um exemplar do Espírito Santo. Nas duas imagens, evidencia-se o córtex com epitélio cúbico estratificado (setas) e medula desorganizada (a). Destaque para as células com núcleos bem arredondados na margem das células (b), que podem se tratar de ovócitos. (A-H&E 400X); (B-H&E 400X).....36

Figura 14. Análise de Componente Principal da carapaça de filhotes natimortos de *C. caretta*. Após a sobreposição das coordenadas procrustes, gerou-se essa distribuição dos sexos, onde os machos são representados pelos pontos azuis e as fêmeas pelos pontos rosas. Observou-se que há uma sobreposição entre os sexos, evidenciando que não houve uma separação total entre esses, que não há um padrão definido para cada um dos sexos.....37

Figura 15. Grade de deformação baseada nos valores de PC1, com vetores indicando o sentido da deformação. É possível observar uma deformação na região da carapaça onde se localizam as placas vertebrais tendendo ao alargamento de toda essa área, assim como na região caudal dos filhotes de *C. caretta*. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.....38

Figura 16. Grade de deformação gerada a partir de PC2, com vetores indicando o sentido da deformação na carapaça, na qual é visível o alargamento da região vertebral, com todas as placas vertebrais tendendo a alargar-se, exceto o último par, que assim como a região caudal, tendeu ao achatamento. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.....38

Figura 17. Distribuição dos sexos gerada após a análise de função discriminante, que foi amplificada em 10 vezes, para enfatizar a diferença entre os grupos. As barras azuis representam os machos e as barras vermelhas representam as fêmeas.....39

Figura 18. Análise de Componente Principal do plastrão de filhotes natimortos de *C. caretta*. Após a sobreposição das coordenadas procrustes do plastrão, gerou-se essa distribuição dos sexos, onde os machos são representados pelos pontos azuis e as fêmeas pelos pontos rosas. Observou-se que há uma sobreposição entre os sexos, assim como houve na análise da carapaça evidenciando que não houve uma separação total entre esses.....40

Figura 19. Grade de deformação baseada nos valores de PC1, com vetores indicando o sentido da deformação. É possível observar uma deformação na parte lateral do plastrão, tendendo ao achatamento dessa área, particularmente entre as placas peitoral e abdominal dos filhotes de *C. caretta*. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.....40

Figura 20. Grade de deformação gerada a partir de PC2, com vetores indicando o sentido da deformação no plastrão, onde é visível novamente uma tendência para o achatamento, na mesma região evidenciada em PC1, porém com maior destaque para a área de junção entre as placas umeral e peitoral. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.....41

Figura 21. Distribuição dos sexos gerada após a análise de função discriminante, que foi amplificada em 10 vezes, para enfatizar a diferença entre os grupos. As barras azuis representam os machos e as barras vermelhas representam as fêmeas. Ainda assim,

houve sobreposição dos grupos, com as fêmeas tendendo a formar um padrão separado.....42

Figura 22. Análise de Componente Principal da carapaça de filhotes natimortos de *C. caretta*. Após a sobreposição das coordenadas procrustes, gerou-se essa distribuição dos sexos, onde os machos são representados pelos pontos azuis e as fêmeas pelos pontos rosas. Observou-se que há uma sobreposição entre os sexos, evidenciando que não houve uma separação total entre esses, que não há um padrão definido para cada um dos sexos.....42

Figura 23. Grade de deformação baseada nos valores de PC1, com vetores indicando o sentido da deformação. É possível observar uma deformação acentuada apenas na parte lateral direita da carapaça, tendendo ao achatamento do primeiro, segundo e terceiro pares de placas laterais, na parte antero mediana da carapaça dos filhotes de *C. caretta*. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.....43

Figura 24. Grade de deformação gerada a partir de PC2, com vetores indicando o sentido da deformação na carapaça, na qual nota-se um resultado totalmente diverso de PC1, tendendo ao alargamento da carapaça, especialmente no primeiro par de placas laterais (direito e esquerdo) e na região caudal. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.....44

Figura 25. Distribuição dos sexos gerada após a análise de função discriminante, que foi amplificada em 10 vezes, para enfatizar a diferença entre os grupos. As barras azuis representam os machos e as barras vermelhas representam as fêmeas.....44

Figura 26. Análise de Componente Principal do plastrão de filhotes natimortos de *C. caretta*. Após a sobreposição das coordenadas procrustes, gerou-se essa distribuição dos sexos, onde os machos são representados pelos pontos azuis e as fêmeas pelos pontos rosas. Observou-se que há uma sobreposição entre os sexos, evidenciando que não houve uma separação total entre esses, que não há um padrão definido para cada um dos sexos.....45

Figura 27. Grade de deformação baseada nos valores de PC1, com vetores indicando o sentido da deformação. É possível observar uma tendência ao alargamento de toda a estrutura do plastrão, com exceção da região caudal, que apresentou um achatamento nessa área. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.....45

Figura 28. Grade de deformação gerada a partir de PC2, com vetores indicando o sentido da deformação no plastrão, na qual é visível que se manteve a tendência de alargamento observada em PC1, com destaque para a região da placa abdominal. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.....46

Figura 29. Distribuição dos sexos gerada após a análise de função discriminante, que foi amplificada em 10 vezes, para enfatizar a diferença entre os grupos. As barras azuis representam os machos e as barras vermelhas representam as fêmeas. Nota-se que não houve separação entre os sexos levando em consideração as medidas amostradas no plastrão dos espécimes do Estado do Espírito Santo.....46

Figura 30. Análise de Componente Principal da carapaça de filhotes natimortos de *C. caretta* dos estados da Bahia e do Espírito Santo. Após a sobreposição das coordenadas procrustes, gerou-se essa distribuição com base na localidade de coleta dos exemplares,

no qual os espécimes do Espírito Santo são representados pelos pontos azuis e os espécimes da Bahia são representados pelo pontos vermelhos. Observou-se que há uma sobreposição entre as duas localidades.....47

Figura 31. : Grade de deformação gerada a partir de PC1, com vetores indicando o sentido da deformação na carapaça. Figura A representa os valores positivos de PC1 enquanto a figura B representa os valores negativos. Foi possível observar em A que houve um achatamento dos dois primeiros pares de placas laterais. Já quando foi avaliada apenas a figura B, a variação se restringiu apenas a região caudal, que apresentou um achatamento. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.....48

Figura 32. Grade de deformação gerada a partir de PC2, com vetores indicando o sentido da deformação na carapaça. Figura A representa os valores positivos de PC1 enquanto a figura B representa os valores negativos. Em A, pode-se observar uma tendência ao alargamento das placas laterais e da região caudal. Essas alterações também foram perceptíveis nos valores negativos de PC2 (B). A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.....49

Figura 33. Distribuição dos espécimes dos dois Estados brasileiros, gerada após a análise de função discriminante, que foi amplificada em 10 vezes, para enfatizar a diferença entre os grupos. As barras azuis representam os indivíduos do Espírito Santo e as barras vermelhas representam os da Bahia. 2-3 corresponde aos grupos aos quais as amostras foram comparadas.....49

Figura 34. Análise de Componente Principal do plastrão de filhotes natimortos de *C. caretta* dos estados da Bahia e do Espírito Santo. Após a sobreposição das coordenadas procrustes, gerou-se essa distribuição com base na localidade de coleta dos exemplares, no qual os espécimes do Espírito Santo são representados pelos pontos azuis e os espécimes da Bahia são representados pelos pontos vermelhos. Observou-se que há uma sobreposição entre as duas localidades.....50

Figura 35. Grade de deformação gerada a partir de PC1, com vetores indicando o sentido da deformação no plastrão. Figura A representa os valores positivos de PC1 enquanto a figura B representa os valores negativos. Em A, pode-se observar que a variação foi muito singela, o que pode ser percebida pelo gradil de deformação pouco alterado. Já em B, foi possível observar as variações ocorridas, que tenderam ao alargamento da região das placas abdominais. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.....51

Figura 36. Grade de deformação gerada a partir de PC2, com vetores indicando o sentido da deformação no plastrão. Figura A representa os valores positivos de PC1 enquanto a figura B representa os valores negativos. Em ambas as figuras, deformação registrada foi muito discreta, haja vista o gradil de deformação levemente alterado. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.....52

Figura 37. Distribuição dos espécimes dos dois Estados brasileiros, gerada após a análise de função discriminante, que foi amplificada em 10 vezes, para enfatizar a diferença entre os grupos. As barras azuis representam os indivíduos do Espírito Santo e as barras vermelhas representam os da Bahia. 2-3 corresponde aos grupos aos quais as amostras foram comparadas.....52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. Tartarugas marinhas.....	17
2.2. <i>Caretta caretta</i>	20
2.3. Sistema uro-genital das tartarugas: características e histologia.....	23
2.4. Morfometria geométrica como ferramenta em estudos com quelônios.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Obtenção dos espécimes.....	28
3.2. Análises histológicas.....	29
3.3. Coleta dos dados e análises morfométricas.....	30
4. RESULTADOS.....	33
4.1. Análise histológica.....	33
4.2. Análise morfométrica.....	37
5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÕES.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

Os répteis atuais são representados pelos clados Archosauria (crocodilos e aves), Testudines (tartarugas) e Lepidosauria (tuataras, serpentes, lagartos e anfisbênias) (VITT & CALDWELL, 2014).

A Ordem Testudines ou Chelonia, da qual as tartarugas marinhas fazem parte, juntamente com as tartarugas de água doce e as terrestres, surgiu há cerca de 240 milhões de anos (SCHOCH & SUES, 2015), no fim do período Triássico, sendo as formas terrestres portadoras de uma forte armadura, com função de blindagem, embora se acredite que todas as tartarugas (terrestres ou não) evoluíram de ancestrais aquáticos (GAUTHIER *et al.*, 2012).

O corpo dos quelônios está envolto dentro dos ossos superiores (carapaça) e inferiores (plastrão) e em algumas espécies esses ossos se encaixam firmemente, protegendo completamente os membros e a cabeça (VITT & CALDWELL, 2014). A Ordem Chelonia possui grupos ecologicamente diversos, com animais totalmente aquáticos (exceto no que diz respeito à deposição de ovos) e outros totalmente terrestres; alguns são pequenos enquanto outros são gigantesco; há animais herbívoros e também carnívoros (VITT & CALDWELL, 2014).

A espécie *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) (Testudines, Cheloniidae), conhecida popularmente como tartaruga cabeçuda, apresenta distribuição circunglobal e, no Brasil, desova principalmente em áreas localizadas do Norte do Estado da Bahia, do Estado do Espírito Santo, Norte do Estado do Rio de Janeiro e do Estado de Sergipe (SANTOS *et al.*, 2011). Porém, alguns espécimes, em diferentes estágios de vida, também são observados na costa de diversos Estados do Brasil, desde o estado do Pará até o estado do Rio Grande do Sul (SANTOS *et al.*, 2011).

As tartarugas marinhas, de modo geral, possuem um ciclo reprodutivo considerado tardio, com a maturidade sexual sendo atingida por volta de 25 anos de vida e sofrem alto grau de predação de seus ovos e filhotes (SANTOS *et al.*, 2011). Associado a essas características biológicas e ecológicas das espécies, há ainda interações negativas com fatores antrópicos, como pesca e poluição (MENDES *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2015), que justificam a estatística de que a cada 1000 filhotes nascidos, um, no máximo dois, chegarem à idade adulta (SANTOS *et al.*, 2011).

Por serem animais em constante perigo de extinção e facilmente afetados pelos impactos da humanidade na natureza, técnicas não-invasivas que possibilitem estudos

conservacionistas se tornam necessárias, principalmente quando levado em consideração a dificuldade em diferenciar-se externamente o sexo dos filhotes (ERNST & BARBOUR, 1989).

Dessa forma, outros estudos, como os de Monteiro & Reis (1999), de Valenzuela *et al.* (2004) e de Ferreira-Júnior *et al.* (2011) têm sido realizados utilizando-se a técnica de morfometria geométrica, um ramo da estatística, que permite, através da análise da marcação de marcos anatômicos (*landmarks*) nos objetos de estudo, observar-se variações em sua forma, sendo útil, para ilustrar proximidade filogenética entre os animais, diferenciação sexual, entre outros.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivos verificar se existem diferenças na forma e tamanho das placas da carapaça de filhotes machos e fêmeas de *Caretta caretta*; verificar se há diferença na razão sexual entre os filhotes nascidos de populações oriundas do estado da Bahia e do estado do Espírito Santo; observar e descrever a morfologia e a anatomia das gônadas de filhotes machos e fêmeas de *C. caretta*; relacionar o dimorfismo sexual gonadal com as regiões da carapaça dos espécimes de *C. caretta* analisados e verificar se há diferença na carapaça e plastrão entre os dois locais de coleta.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tartarugas marinhas

Atualmente, são contabilizados 453 taxa modernos para tartarugas, sendo reconhecidas 335 espécies (Van DIJK *et al*, 2014), que ocupam os mais variados ambientes, desde rios, lagos e pântanos até aquelas que vivem exclusivamente no ambiente terrestre ou marinho (FERREIRA-JÚNIOR, 2009).

Existem sete espécies atuais de tartarugas marinhas no mundo e dessas, cinco ocorrem no Brasil: *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758), conhecida como tartaruga cabeçuda, *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), chamada de tartaruga verde, *Dermochelys coriacea* (Linnaeus, 1758) a tartaruga gigante, *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766), a tartaruga de pente e *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829), a tartaruga oliva (Figura 1). As outras espécies que não ocorrem no Brasil são *Natator depressus* (Garman, 1880), endêmica da Austrália e *Lepidochelys kempii* (Garman, 1880), encontrada no Golfo do México (Figura 2) Somente *D. coriacea*, está incluída na família Dermochelyidae, enquanto as outras seis espécies são caracterizadas na família Cheloniidae. As espécies *C. caretta* e *L. olivacea* encontram-se em perigo, *E. imbricata* e *D. coriacea* estão criticamente em perigo e *C. mydas* está classificada como vulnerável, de acordo com o Ministério do Meio Ambiente (ICMBIO, 2016). Já quando se leva em consideração os critérios da International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) os status são, respectivamente: vulnerável, vulnerável, criticamente ameaçada, vulnerável e ameaçada (IUCN, 2016). Já *N. depressus* apresenta carência de informações e *L. kempii* está classificada como criticamente ameaçada (IUCN, 2016).



Figura 1: Fotografias das tartarugas que ocorrem no Brasil: A- *Chelonia mydas*; B-*Lepidochelys olivacea*; C- *Eretmochelys imbricata*; D- *Dermochelys coriacea*; E- *Caretta caretta*. Fotos: Sarah da Silva Mendes (A, C, D e E) e Reptile Database (B).



Figura 2: Fotografias das tartarugas que não ocorrem no Brasil: A- *Natator depressus*; B- *Lepidochelys kempii*. Fonte: Reptile Database (2017).

As espécies atuais das tartarugas marinhas formam um grupo monofilético da subordem Cryptodira, no qual todos os animais retraem a cabeça sobre um plano vertical (STERLI, 2010). Quando comparadas com as outras espécies que compõem a subordem Cryptodira, as tartarugas marinhas possuem habilidade muito limitada para retração da cabeça, porém apresentam espessa e completa cobertura sobre o crânio, que lhes confere proteção adicional a essa região (STERLI, 2010).

Nos quelônios a determinação sexual pode ocorrer de duas formas: dependente da temperatura de incubação (*Temperature-Dependent Sex Determination* - TSD), que ocorre na maioria das espécies, inclusive em todas as espécies de tartarugas marinhas (FERREIRA-JÚNIOR, 2009; KAWAGOSHI *et al.*, 2012) ou através da determinação genotípica (*Genotypic Sex Determination* - GSD), com os machos possuindo os heterogametas (XY/XX) ou as fêmeas (ZZ/ZY) (KAWAGOSHI *et al.*, 2012). Porém, em 70% das espécies de quelônios o sistema de determinação sexual ainda é desconhecido (FERREIRA-JÚNIOR, 2009). Nas tartarugas, apenas sete espécies foram relatadas como portadoras dos cromossomos sexuais heteromórficos, sendo que cinco possuem o sistema XX/XY (*Acantochelys radiolata* (Mikan, 1820) (Testudines, Chelidae), *Staurotypus salvinii* Gray 1864 (Testudines, Kinosternidae), *Staurotypus triporcatus* (Wiegmann, 1828) (Testudines, Kinosternidae), *Sierbenrockiella crassicollis* (Gray, 1831) (Testudines, Geoemydidae)), *Chelodina longicollis* (Shaw, 1794) (Testudines, Chelidae) e duas possuem o sistema ZZ/ZW (*Pangshura (Kachuga) smithii* (Gray, 1863) (Testudines, Geoemydidae) e *Pelodiscus sinensis* (Wiegmann, 1835) (Testudines, Trionychidae)) (MARTINEZ *et al.*, 2008).

Ainda não está claro, do ponto de vista filogenético, qual tipo de determinação evoluiu primeiro. No entanto, acredita-se que o TSD seria o mecanismo primitivo e que

GSD surgiu de forma independente várias vezes dentro do clado dos quelônios (EWERT & NELSON, 1991; JANZEN & KRENZ, 2004).

No caso do sistema TSD, a temperatura de fato relevante é a que atua efetivamente no período termo-sensitivo. A temperatura anterior e posterior a esse período será determinante apenas para o desenvolvimento do embrião (YNTEMA & MROSOVSKY, 1982). Georges *et al.* (1994) realizaram um estudo com *C. caretta*, no qual comprovaram, através de um modelo, que a proporção diária de desenvolvimento do embrião está mais relacionada com a temperatura do que com o tempo ao qual o embrião ficou exposto a essa temperatura.

Trabalhos realizados com diversos quelônios demonstraram que o efeito da temperatura na determinação sexual dos animais é cumulativo, ou seja, no primeiro terço de desenvolvimento embrionário, a temperatura atua, ainda que de modo reversível, sobre a determinação sexual. Somente após o segundo terço de incubação é que a temperatura irá atuar de forma irreversível, pois é nessa fase que age ativamente sobre a síntese de enzimas envolvidas na diferenciação sexual (BULL & VOGT, 1981; PIEAU, 1996).

2.2 *Caretta caretta*

Os indivíduos da espécie *C. caretta*, ocorrem em todo o litoral brasileiro, sendo observados desde o estado do Pará até o estado do Rio Grande do Sul. Estudos de telemetria realizados no estado da Bahia mostraram a rota migratória de 10 fêmeas em período reprodutivo, revelando um corredor migratório por toda a costa Nordeste do Brasil, com áreas de descanso e alimentação na costa Norte, especialmente no estado do Ceará (MARCOVALDI *et al.*, 2009).

Tartarugas cabeçudas recebem esse nome devido à cabeça ser mais larga quando comparada as outras espécies, possuir forma triangular e com dois pares de escamas pré-frontais (Figura 3). O escudo nugal possui a margem dorsal ao pescoço e está em contato com o primeiro escudo lateral. Os filhotes possuem a carapaça marrom com vários tons de cinza, com plastrão apresentando coloração semelhante, enquanto os adultos possuem a carapaça predominantemente marrom. Às vezes, na carapaça dos juvenis pode ocorrer sobreposição dos escudos marginais, sendo que isso nunca acontece nos adultos. A carapaça pode atingir até 105 cm de comprimento curvilíneo quando adultas e elas podem apresentar até 180 Kg. (PRITCHARD & MORTIMER, 1999).

São animais com ciclo de vida longo, podendo atingir até 100 anos de vida e começam a se reproduzir entre os 25 e 35 anos, sendo que podem ovipositar até 120 ovos em cada ninho (SANTOS *et al.*, 2011), sendo que apenas as fêmeas abandonam o ambiente aquático, no momento da desova (TAMAR, 2009; SANTOS *et al.*, 2011).



Figura 3: Fotografia de uma fêmea de *Caretta caretta* desovando em Regência (ES). Foto: Sarah da Silva Mendes, 2015

O filhote (Figura 4) migra para a plataforma continental até atingir a parte oceânica, aonde irá habitar e se alimentar até tornar-se juvenil. Nessa fase da vida são oportunistas, no que diz respeito à sua dieta, tornando-se carnívoros no estágio de juvenil e adulto (Figura 5) (BOLTEN, 2003).



Figura 4: Fotografia de filhote recém eclodido de *Caretta caretta* em Sítio do Conde (BA). Foto: Sarah da Silva Mendes, 2014

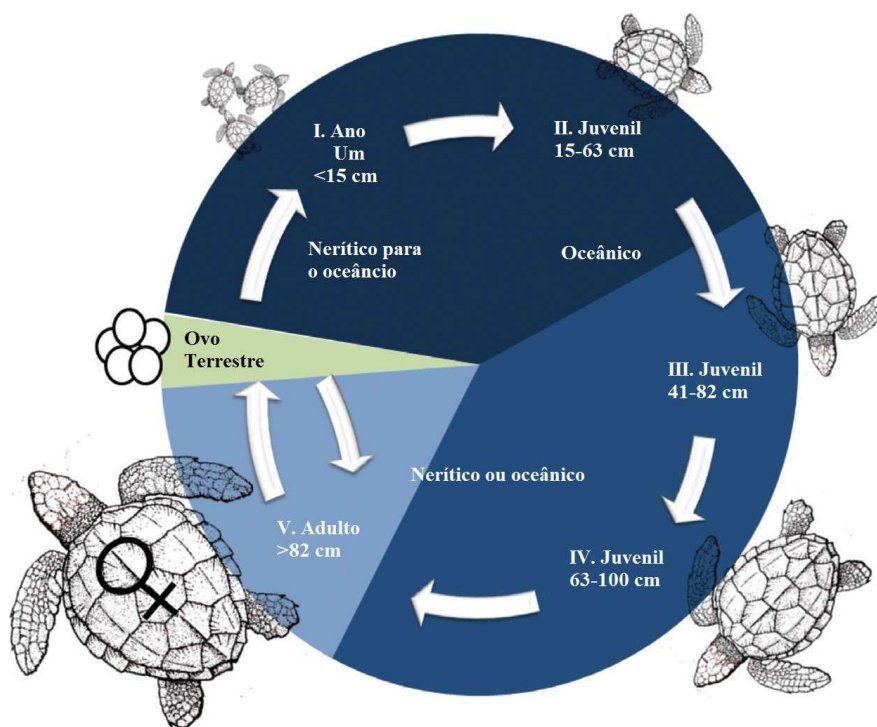


Figura 5: Modelo conceitual da distribuição de tartarugas cabeçudas por estágio de vida e hábitat, conforme proposto por TEWG (2009). O azul mais escuro representa os estágios I e II, ou o estágio mais tradicional da vida oceânica precoce, no qual as tartarugas ocupam exclusivamente os habitats oceânicos após a transição da praia para as águas neríticas. O azul representa os estágios juvenis III e IV, no qual os animais ocupam tanto habitats neríticos e oceânicos. E o azul mais claro representa os adultos que ocupam habitats oceânicos, neríticos e terrestres (esse último apenas para fêmeas). Essa distribuição de tamanho foi derivada de populações atlânticas e não necessariamente refletem as populações globais. Adaptado de Mansfield & Putman (2013).

No Brasil, a temporada reprodutiva dessa espécie ocorre do final de agosto até o fim de fevereiro, sendo os picos de desova de outubro a dezembro (MARCOVALDI & LAURENT, 1996). Estudos feitos com populações de outros países mostraram que o intervalo entre as desovas pode ser de um a nove anos, com média de dois anos e meio a três e numa mesma temporada reprodutiva, uma fêmea pode desovar até sete vezes, com um descanso de até cinco dias entre cada desova (BJORNDAL, 1997; DODD, 1998; SCHROEDER *et al.*, 2003; TAMAR, 2009).

Para *C. caretta*, seu período termo-sensitivo (aquele no qual a ação da temperatura sobre o embrião é irreversível na diferenciação das gônadas) encontra-se no segundo terço do desenvolvimento embrionário (YNTEMA, 1979). Temperaturas mais elevadas produzem fêmeas e mais baixas machos (EWERT & NELSON, 1991), sendo a temperatura de incubação que resulta em 50% de cada sexo denominada de temperatura pivotal (TP), (MROSOVSKY *et al.*, 1984) e, nas populações brasileiras, ela gira em torno de 29,2°C (MARCOVALDI *et al.*, 1997).

A razão sexual é um parâmetro fundamental da história de vida, sendo essencial para o estudo da dinâmica das populações. A proporção sexual no nascimento pode ser diferente da razão sexual entre a população adulta e essa comparação pode informar sobre outros parâmetros envolvidos nesse processo, como diferentes taxas de mortalidade, migração e dispersão diferenciada entre os sexos (BULMER, 1994). No caso dos répteis, essa variação pode ser considerável, variando de 1:1 para mais de 8:1 favorável às fêmeas (MROSOVSKY & PROVANCHA, 1989). Marcovaldi *et al.* (1997) realizaram um estudo a fim de estimar a razão sexual das populações de tartarugas cabeçudas que ocorrem no litoral brasileiro, assim como a temperatura pivotal para essas populações. Para isso, realizaram testes tanto em laboratório quanto nas praias de desova de 11 estados brasileiros. Eles verificaram que a temperatura pivotal para as tartarugas cabeçudas no Brasil é 29,2°C e que na Bahia, assim como na Flórida, há uma razão sexual favorável às fêmeas.

2.3 Sistema Urogenital das tartarugas: características e histologia

O sistema urogenital das tartarugas é composto por um par de rins e ureteres, as gônadas e seus ductos e os derivados das papilas genitais (pênis ou clitóris) no fim da cloaca. Os rins trabalham na remoção dos resíduos nitrogenados e na osmoregulação. Os ureteres transportam os resíduos nitrogenados até a cloaca, onde eles podem ser drenados para a bexiga urinária ou são eliminados. As gônadas produzem os gametas e

seus ductos transportam os ovos ou esperma até a cloaca. A bexiga urinária armazena água e urina. Por fim, a cloaca é uma câmara comum na qual os ureteres, os ductos gonadais, reto e bexiga direcionam seus conteúdos finais. A cloaca se comunica com o exterior através de uma abertura localizada em sua parte distal (WYNEKEN, 2001) (Figura 6).

As gônadas estão localizadas dorsalmente na cavidade do corpo, posterior aos pulmões e ventral aos rins e a parede peritoneal. As fêmeas possuem um par de ovários, ovidutos (também conhecidos como ductos Müllerianos) e ligamentos suspensórios ou mesentéricos. O ovário e o oviduto variam de tamanho e morfologia de acordo com a idade e nos intervalos entre as temporadas reprodutivas. Os machos possuem um par de testículos, epidídimos, ductos deferentes, ligamentos suspensórios e um pênis. Ductos Müllerianos podem persistir em alguns machos como um par de pequenos e lisos tubos, com as paredes bem finas, localizados ao longo da parede corporal, suspensos por um mesotubo, desde o ducto dos testículos ou peritônio, sobrepondo os rins (WYNEKEN, 2001; MALVÁSIO *et al.*, 1999).

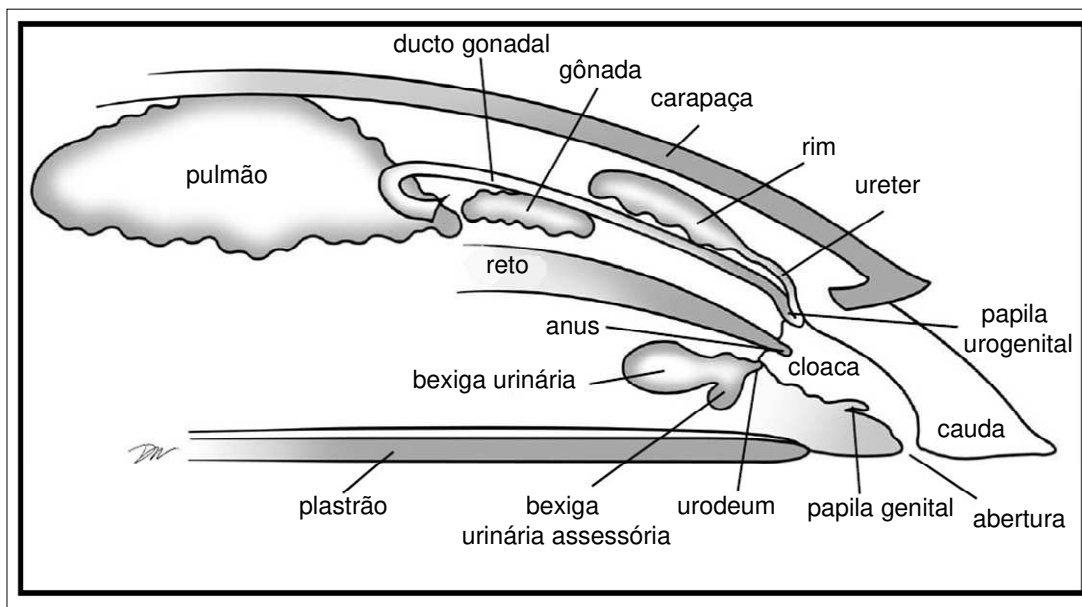


Figura 6: Esquema do sistema urogenital de tartarugas. Adaptado de Wyneken (2001).

Muitas espécies de quelônios apresentam dimorfismo sexual entre os adultos, enquanto os filhotes exibem nenhum ou discreto dimorfismo, que não pode ser detectado externamente (ERNST & BARBOUR, 1989). Os recém-nascidos tipicamente crescem por longos períodos de tempo antes de apresentarem qualquer dimorfismo sexual externo, fato este que levou ao desenvolvimento de várias técnicas invasivas para

se realizar a sexagem dos filhotes (VALENZUELA *et al.*, 2004). Entre essas técnicas, pode-se citar os radioimunoensaios (RIA), que quantificam as concentrações de esteróides circulantes no sangue (PINTO *et al.*, 2015) ou no fluido amniótico dos ovos (GROSS *et al.*, 1995), a histologia gonadal (PINTO *et al.*, 2015) e a observação da morfologia externa das gônadas, seja através de laparoscopia de animais vivos (WOOD *et al.*, 1983) ou pela dissecação de animais mortos, que é a técnica mais comumente utilizada (SÁNCHEZ-OSPINA *et al.*, 2014).

No entanto, vale ressaltar que há grande contradição sobre qual a melhor técnica a ser utilizada para a sexagem de filhotes recém-eclodidos de quelônios (MALVASIO *et al.*, 2012). Yntema & Mrososky (1980) defenderam a análise histológica como a melhor ferramenta para se confirmar o sexo de filhotes recém-eclodidos de *C. caretta*. Porém, Whitmore *et al.* (1985) afirmam que basta apenas a observação macroscópica das gônadas para se realizar a diferenciação dos sexos de filhotes de *C. mydas*.

No trabalho realizado com filhotes recém-eclodidos das espécies *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) e *Podocnemis unifilis* Troscchel, 1848 (Testudines, Podocnemididae) não foi observada diferença histológica entre as gônadas das duas espécies, o que permitiu que fossem adotados os mesmos critérios de diferenciação do sexo para ambas as espécies. Os testículos apresentaram formato ovóide e os ovários mostraram-se relativamente mais alongados, sendo que ambos localizavam-se junto ao hilo renal (MALVASIO *et al.*, 2012). O estudo histológico demonstrou diferenças entre as gônadas dos dois sexos. No caso das fêmeas, observou-se presença de apêndice remanescente no oviduto, epitélio composto por células cúbicas altas, células germinativas posicionadas centralmente aos folículos, apresentando núcleo claro e citoplasma disperso. Os machos possuíam oviduto arredondado, com células cúbicas baixas e ausência de apêndices, túbulos seminíferos com luz dilatada, presentes em toda a gônada, com células germinativas aderidas ao epitélio dos túbulos seminíferos (MALVASIO *et al.*, 2012).

Em estudo realizado por Yntema & Mrososky (1980) com filhotes recém-eclodidos de *C. caretta* não foi observada diferença macroscópica entre testículos e ovários, o que levou a necessidade de exames histológicos para a determinação do sexo dos animais. Os ovários apresentaram-se estruturalmente alongados, da região anterior para a região postero-medial na face ventral dos rins, com o oviduto seguindo lateralmente o ovário. A borda é serrilhada e o epitélio germinativo é delimitado a partir da região medular pela túnica albugínea. Os testículos possuem as bordas serrilhadas,

porém menos serrilhada do que o ovário, além de sua superfície ser lisa e apresentar cordões primários. O epitélio da superfície é constituído por uma camada simples de células pavimentosas, com a túnica albugínea sendo visualizada sob ela, junto com os túbulos seminíferos.

2.4 Morfometria geométrica como ferramenta em estudos com quelônios

Uma nova alternativa que tem sido abordada, a fim de minimizar ou substituir as técnicas invasivas utilizadas atualmente é a morfometria geométrica. Ela pode ser definida como a fusão entre a geometria e a biologia, compreendendo o estudo da forma em um espaço bi ou tri-dimensional, que permite a investigação, em profundidade, de mudanças morfológicas (MOLEN *et al.*, 2007).

Bookstein (1991) definiu a morfometria como “o estudo estatístico da covariância entre mudanças de formas e fatores causais”, de modo que a morfometria estuda exatamente as causas das diferenças de forma entre organismos, sejam ecológicas ou filogenéticas (MONTEIRO & REIS, 1999).

Essa técnica propõe o estudo das variações na forma e no tamanho a partir do deslocamento no plano (2D) ou no espaço (3D) de um conjunto de pontos homólogos ou *landmarks*, que são definidos como “locais que têm nomes (ponte do nariz, ponta do queixo) e que servem como boas coordenadas cartesianas” (BOOKSTEIN, 1991). Esses nomes são dados de modo a criar uma correspondência entre as formas (homologia biológica). Assim, esses pontos anatômicos não apresentam apenas suas próprias localizações, como essas devem ser exatamente as mesmas em todos os outros exemplares da amostra (MITTEROECKER & GUNZ, 2009). A relação espacial em duas ou três dimensões dessas *landmarks* se conserva ao longo de toda a análise, o que permite reconstruir com grande precisão a forma e o tamanho da espécie estudada.

Durante a última década, estudos anatômicos foram complementados através da morfometria geométrica, permitindo o cálculo e a visualização de mudanças da forma global de órgãos e organismos (DEPECKER *et al.*, 2006). Depecker *et al.* (2006) utilizaram a morfometria geométrica para avaliar a forma da cintura escapular dos diversos grupos de quelônios existentes, correlacionando o hábito de cada uma delas e a forma dessa estrutura. Seus resultados mostraram que existem quatro padrões diferentes para a cintura escapular e os valores da análise de componente principal explicaram 73,2% da variação encontrada entre os grupos analisados, num total de 88 espécimes,

distribuídos em 57 espécies e 13 famílias, mostrando mais uma vez a plasticidade de estudos que podem ser realizados através das análises com a morfometria geométrica.

Rivera (2011) avaliou populações de jovens de *Pseudemys concinna* (Le Conte, 1830) (Testudines, Emydidae) que habitam diferentes regimes de fluxos aquáticos (lênticos e lóticos) e a forma da carapaça e do plastrão de machos e fêmeas que vivem em cada um desses tipos de ambiente. Ele verificou que a velocidade do fluxo d'água parece interferir na forma da carapaça e do plastrão de ambos os sexos, pois os animais que viviam no mesmo tipo de ambiente apresentam o mesmo padrão de forma e esse era distinto quando comparado nos dois tipos de ambientes.

Ferreira-Júnior *et al.* (2011) realizaram um estudo no qual a morfometria geométrica foi utilizada para se verificar as variações na forma da carapaça e do plastrão de filhotes da tartaruga marinha *C. Caretta*, de modo a correlacionar essas diferenças com o tempo de incubação ao qual cada um dos ovos foi submetido. Foi verificado que filhotes que ficaram incubados por mais tempo apresentaram a carapaça comprimida na região cranial e a região anal era mais ampla e longa, quando comparada com a carapaça dos filhotes que ficaram menos tempo incubados na areia.

Através de estudos de morfometria geométrica, Valenzuela *et al.* (2004) conseguiram diferenciar machos de fêmeas de duas espécies de tartarugas de água doce, *Chrysemys picta* (Schneider, 1783) (Testudines, Emydidae) e *P. expansa*, com alta precisão na atribuição do sexo, e concluíram que a morfometria geométrica fornece aos pesquisadores uma poderosa ferramenta para diferenciar os sexos em filhotes de tartarugas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos espécimes

Foram realizadas duas incursões de coleta: a primeira na praia de Sítio do Conde (11°51'12.87''S, 37°33'45.74''O), localizada no município de Conde, norte do estado da Bahia, entre janeiro e fevereiro de 2014 (Figura 7) e a segunda na Reserva Biológica de Comboios, localizada em Regência Augusta (19°40'15.92''S, 39°52'55.92''O), distrito do município de Linhares, norte do estado do Espírito Santo, entre dezembro de 2014 e fevereiro de 2015. As coletas foram autorizadas pelo Sisbio-ICMBio (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do Instituto Chico Mendes) n° 41428-1 e pelo Projeto Tamar. As coletas aconteceram em dois turnos distintos: no início da manhã, entre 6h até às 09h30min e durante a tarde, entre 17h e 18h30min, dependendo da logística adotada pelo Projeto Tamar.



Figura 7: Fotografia mostrando a abertura de ninho e coleta dos natimortos de *Caretta caretta* em Sítio do Conde (BA). Foto: João Abreu, 2014.

Nos dois Estados foram consultados os bancos de dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) para obtenção da temperatura do ar.

Os filhotes natimortos coletados, excluindo aqueles com má-formações na carapaça e/ou plastrão, foram conservados sob condições de resfriamento à 4°C e,

posteriormente, transportados em caixas de isopor para as respectivas bases do Projeto Tamar em Sítio do Conde e Regência Augusta, onde as análises foram realizadas. Os exemplares foram agrupados de acordo com o ninho em que foram coletados e armazenados em sacos plásticos “zip-lock” devidamente identificados. Posteriormente foram colocados na posição de decúbito ventral e o plastrão foi retirado com tesoura de ponta fina e curva, através de um corte desde as axilas até a região inguinal conforme WYNEKEN (2001). Com o auxílio de uma pinça, vísceras como fígado, intestino e bexiga foram retirados, de modo que os rins e as gônadas ficassem expostos e assim, isolados do corpo dos animais. Um monobloco contendo gônadas, rins, glândulas adrenais foi fotografado (Figura 8) e imediatamente imerso em solução fixadora (formalina 10% tamponada).

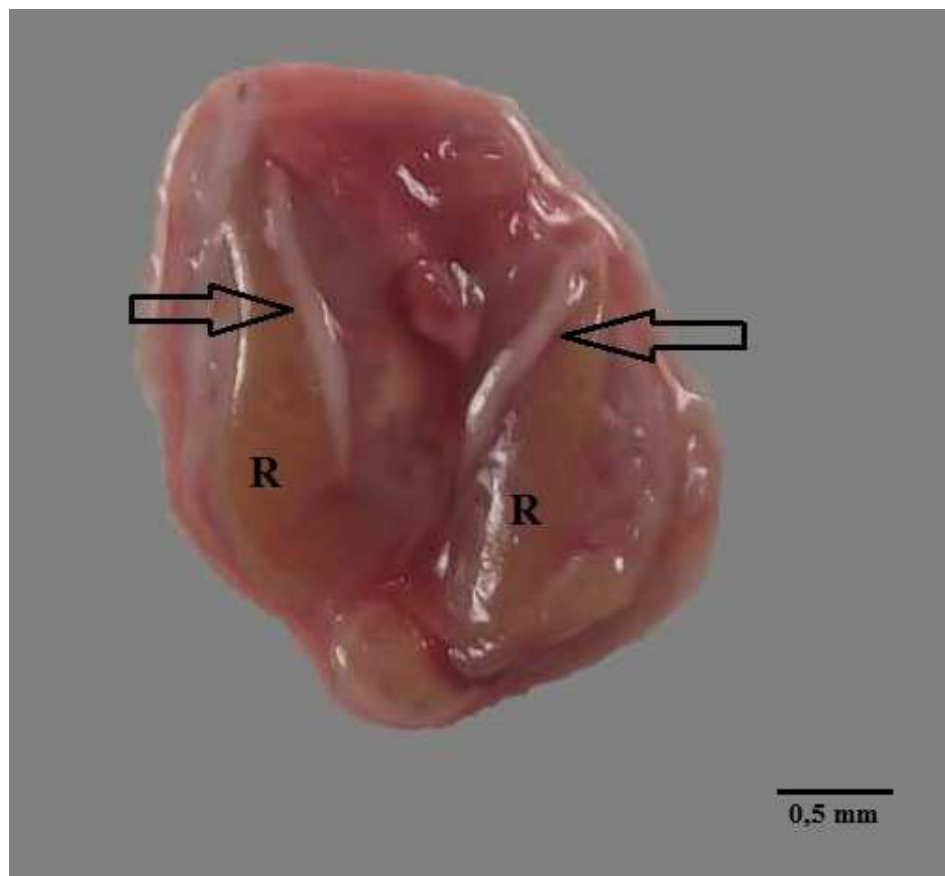


Figura 8: Fotografia de um dos monoblocos amostrados, contendo as gônadas (destacadas pelas setas) e os rins, representados pela letra R. Foto: Sarah da Silva Mendes

3.2 Análises histológicas

Os 204 monoblocos fixados foram submetidos às etapas da técnica histológica convencional (TOLOSA *et al.*, 2003), que consistiu em um processo de desidratação em

álcool (em diferentes concentrações, sendo a inicial de 70% e finalizando com 100%). Logo após, seguiu-se a diafanização com xilol, realizando-se em seguida a impregnação em parafina. Após o processamento histológico, cuidadosamente, as gônadas e rins de cada espécime foram emblocados em parafina. Os blocos rígidos com os tecidos foram levados ao micrótomo, onde foram seccionados cortes longitudinais de 4 µm de espessura, em diversos níveis de profundidade. Em seguida, os cortes foram distendidos em lâminas e submetidos à coloração de rotina hematoxilina-eosina (H&E) (TOLOSA *et al.*, 2003). Após a montagem com lamínula e Bálsamo do Canadá, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz. Toda a técnica histológica e análise microscópica foram realizadas no laboratório de Histologia, do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Foram confeccionadas 1200 lâminas histológicas, e dessas, foram coradas em H&E duas lâminas de cada exemplar. As demais foram armazenadas, com os cortes em branco, para posteriores colorações que fossem necessárias. Todas as lâminas coradas foram fotografadas no microscópio de contraste interferencial diferencial, modelo BX41, marca Olympus, DIC, localizado no Laboratório Avançado de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

3.3 Coleta dos dados e análises morfométricas

Para as análises da forma e registro de detalhes importantes da carapaça e do plastrão foram tomadas fotos de ambas as estruturas de cada um dos espécimes amostrados (83 natimortos para as análises referentes ao estado da Bahia sendo 68 fêmeas e 15 machos e 91 para as referentes ao estado do Espírito Santo, com um total de 53 fêmeas e 38 machos), antes das gônadas serem retiradas, utilizando uma câmera digital, com função macro, Fujifilm®, modelo FINEPIX S2800 HD, fixada a uma altura de 20 centímetros dos espécimes. Uma régua de 30 cm foi utilizada como referência de escala. Em cada imagem da carapaça foram selecionados 30 *landmarks* (Figura 9), de acordo com Valenzuela *et al.* (2004). Já para as imagens do plastrão, foram selecionadas 12 *landmarks* (Figura 10), conforme Ferreira *et al.* (2011).

Bookstein (1991) classificou as *landmarks* em três tipos: I, II e III. As *landmarks* do Tipo I são justaposições discretas de tecidos, as do Tipo II são pontos de máxima curvatura ou processos morfogenéticos locais e as do Tipo III são pontos extremos definidos por distâncias através de uma determinada forma. As *landmarks* utilizadas neste estudo foram as do tipo I. Para as análises de morfometria geométrica, foi gerado

um banco de imagens a partir do programa TPSUtil (ROHLF 2010a). Em seguida, os *landmarks* selecionados foram pontuados através do programa TPSDig2 (ROHLF, 2010b).

Após a prévia identificação dos sexos pela histologia, no programa MorphoJ (KLINGENBERG, 2011), foi realizada a análise de componentes principais (*Principal Components Analysis* – PCA) sobre as coordenadas brutas de cada um dos *landmarks* amostrados, a fim de ordenar e visualizar graficamente os dois grupos (macho X fêmea). No mesmo programa foi realizada a Análise de Função Discriminante, para os mesmos dois grupos. Os mesmos testes foram realizados para verificar se há diferença na carapaça e plastrão dos exemplares coletados nas diferentes localidades amostradas (Bahia x Espírito Santo). A visualização das variações de forma evidenciando o dimorfismo sexual foram representadas por gradis de deformação, baseado em deslocamento de vetores conforme Valenzuela *et al.* (2004).

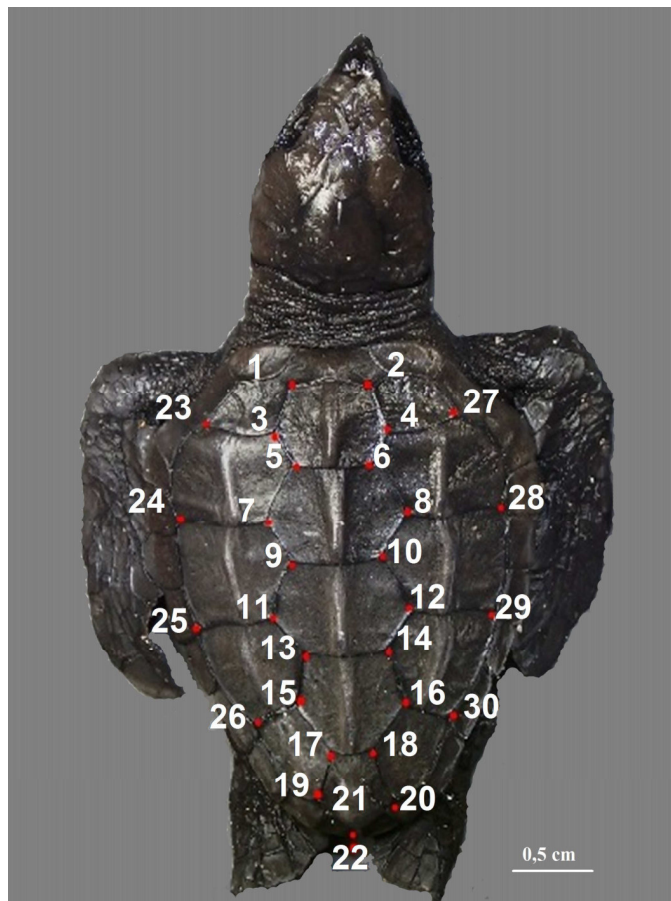


Figura 9: Fotografia evidenciando as *landmarks* registradas na carapaça de filhote de *Caretta caretta*.

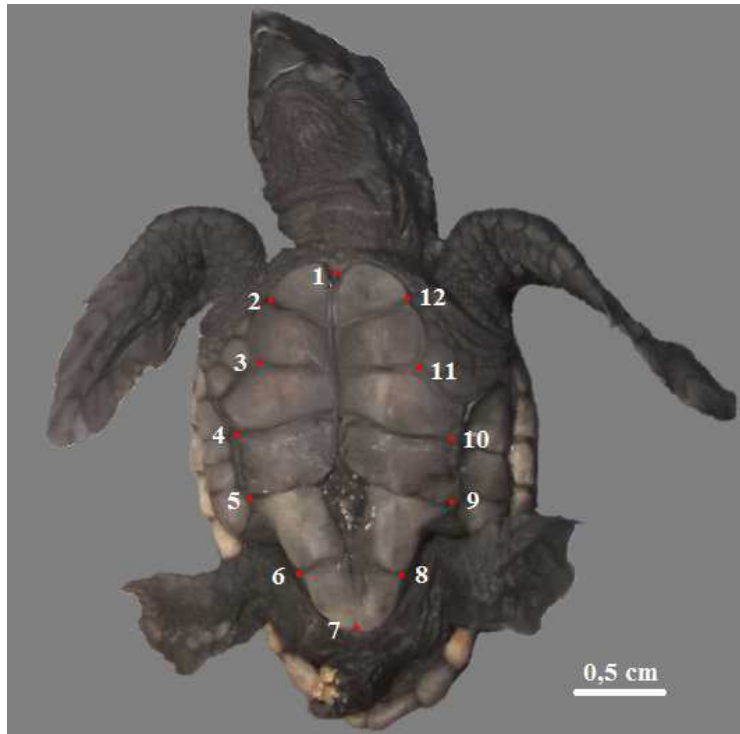


Figura 10: Fotografia evidenciando as *landmarks* registradas no plastrão de filhote de *Caretta caretta*.

4. RESULTADOS

4.1 Análise histológica

Anatomicamente as gônadas estavam justapostas à cápsula renal em contato com o córtex renal, apresentavam formato filiforme e coloração esbranquiçada (Figura 11). Foi possível a visualização do córtex renal e das glândulas adrenais, sendo estas localizadas entre os rins dos animais.

Após a análise histológica, registrou-se uma maior ocorrência no nascimento de fêmeas nas coletas realizadas do estado da Bahia, totalizando 68 fêmeas, 15 machos e 20 espécimes cujo sexo não pode ser identificado devido ao elevado grau de autólise dos tecidos, quanto no estado do Espírito Santo, que totalizou 53 fêmeas, 38 machos e 10 espécimes que não puderam ser identificados.

Quando foi calculada a razão sexual dos filhotes amostrados, o estado da Bahia apresentou valor de 4,5:1 favorável as fêmeas (82% das amostras correspondiam à fêmeas) enquanto que o estado do Espírito Santo apresentou o valor de 1,4:1 também favorável as fêmeas (58% de fêmeas). A temperatura média do ar foi de 29,9°C na Bahia e de 27,1°C no Espírito Santo.

A gônada masculina apresenta o córtex constituído por um epitélio pavimentoso simples e uma região medular preenchida quase que totalmente por estruturas tubulares, permeadas por um interstício vascularizado. Essas estruturas tubulares são túbulos seminíferos, que se apresentam em seções longitudinais, transversas, oblíquas e algumas tangenciais. Pode-se ver que esses túbulos estão revestidos por um epitélio aparentemente simples constituído por células de citoplasma claro e núcleo centralizado (Figura 12).

O córtex dos ovários constituiu-se por epitélio cúbico, estratificado ou não e bem desenvolvido, com uma região medular desorganizada e rica em matriz intersticial, onde se observou células com aspecto ovalado e núcleo bem centralizado que podem representar células germinativas (Figura 13).

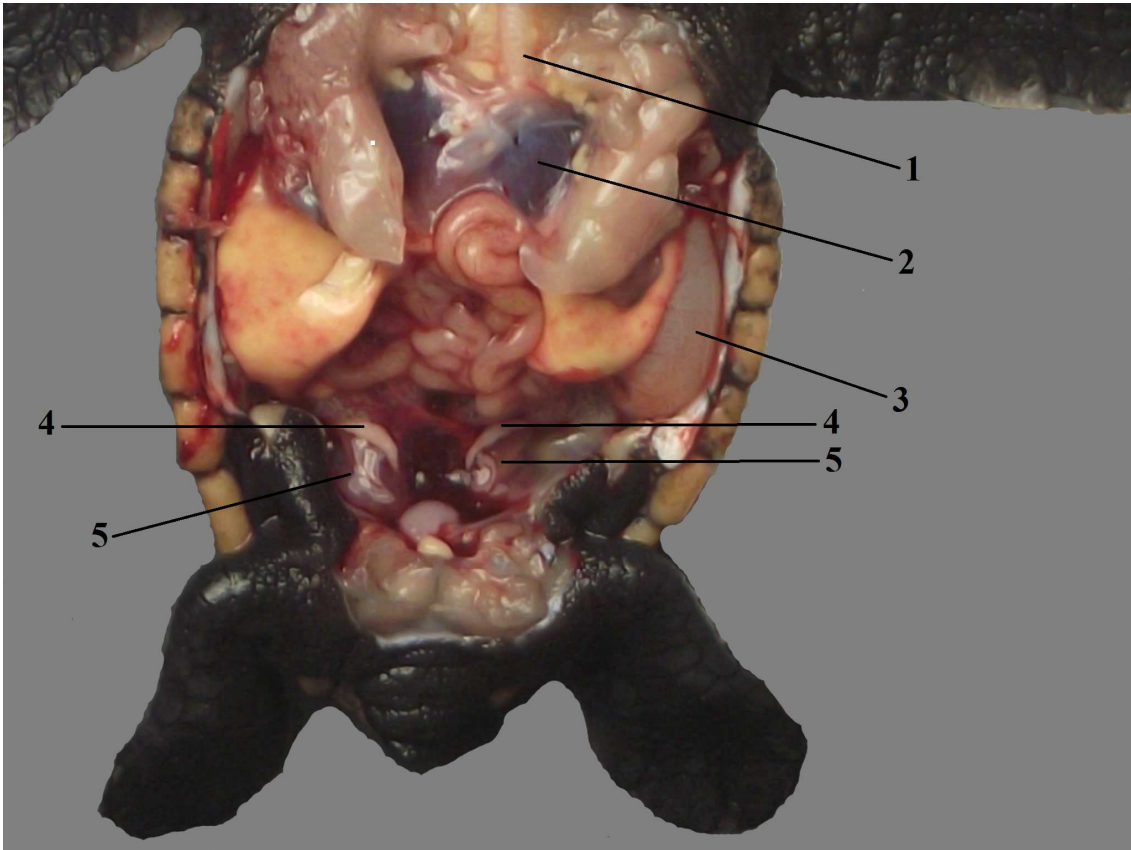


Figura 11: Espécime de *Caretta caretta* , em vista ventral da cavidade peritoneal de *Caretta caretta*, destacando-se: 1: traqueia; 2: coração; 3: estômago; 4: gônada; 5: rim. Foto: Sarah da Silva Mendes

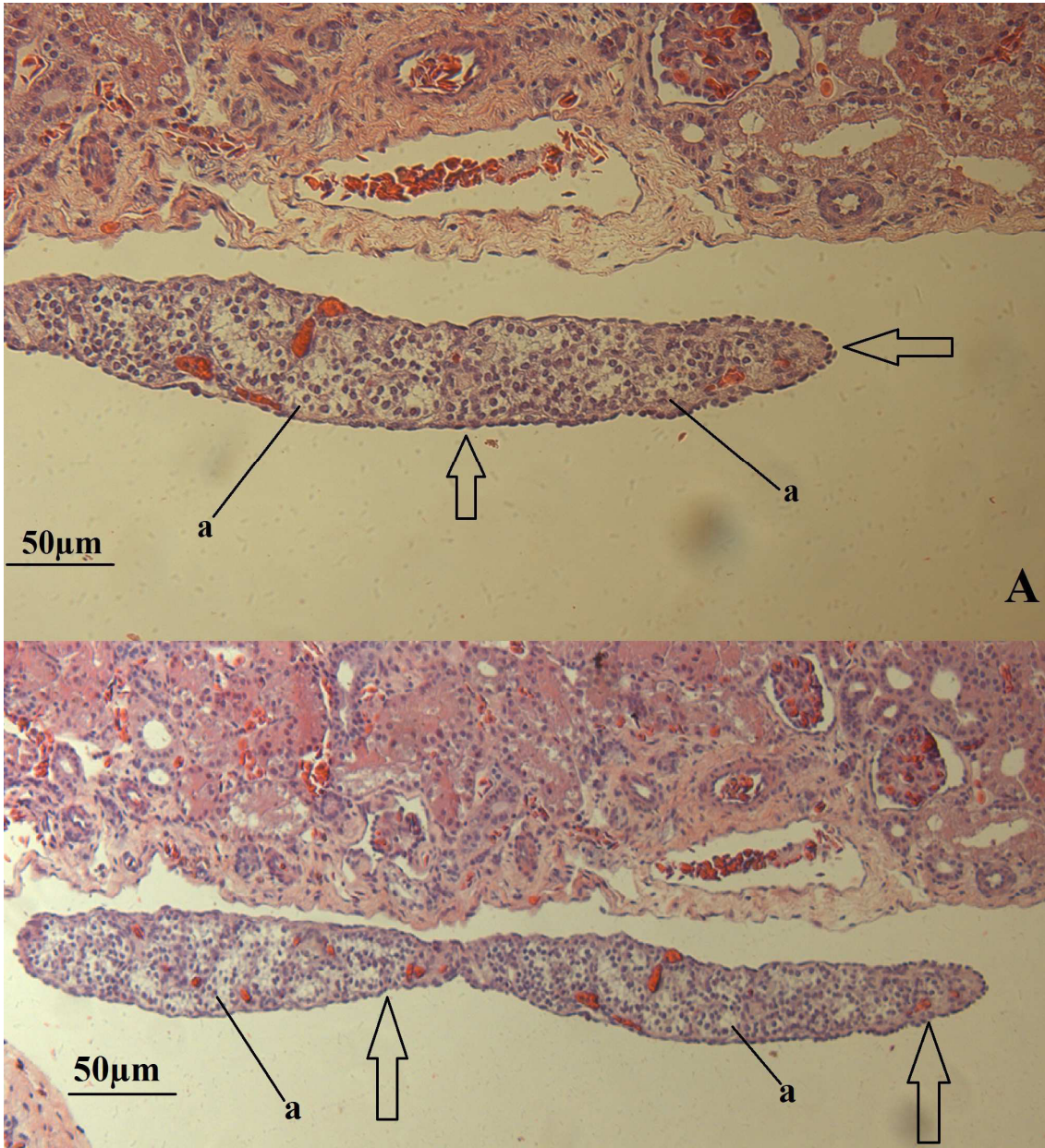


Figura 12: Fotomicrografia, em corte longitudinal, do testículo de *Caretta caretta*. Em A, observa-se o testículo de um espécime coletado na Bahia e em B o de um exemplar do Espírito Santo. Em ambas as imagens destaca-se o córtex com epitélio pavimentoso simples (setas pretas), medula bem desenvolvida, com destaque para os túbulos seminíferos (a). (A-H&E 100X); (B-H&E 100X).

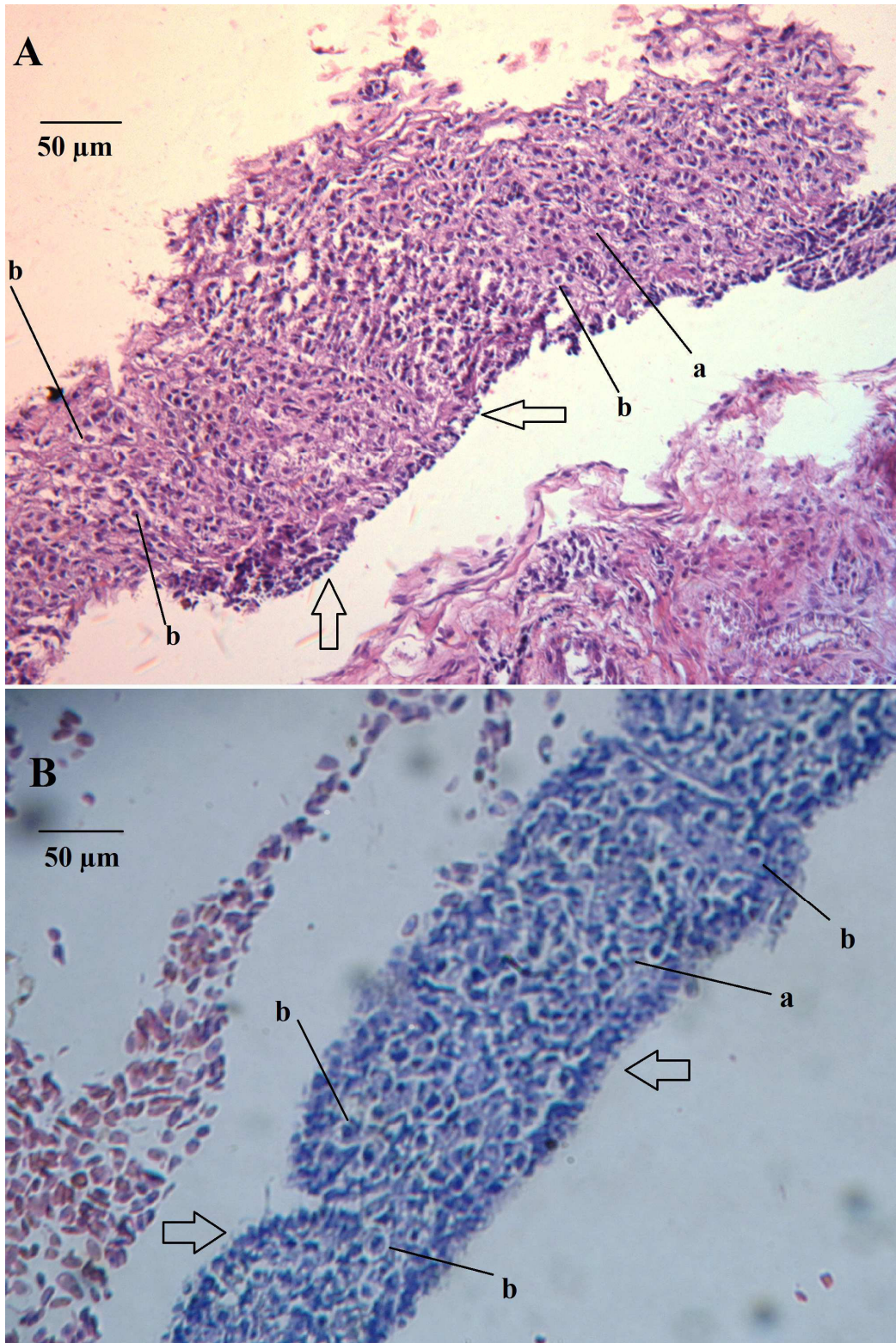


Figura 13: Fotomicrografia, em corte longitudinal, do ovário de *Caretta caretta*. Em A observa-se a gônada de um espécime da Bahia e em B de um exemplar do Espírito Santo. Nas duas imagens, evidencia-se o córtex com epitélio cúbico estratificado (setas pretas) e medula desorganizada (a). Destaque para as células com núcleos bem arredondados na margem das células (b), que podem se tratar de ovócitos. (A-H&E 400X); (B-H&E 400x).

4.2 Análise morfométrica

Analisando a carapaça dos filhotes do estado da Bahia, foi aplicada a análise de componentes principais (PCA), no qual se verificou que o Componente Principal 1 (PC1) explicou 25,45% da variação da forma e o Componente Principal 2 (PC2) explicou 12,14%. Os machos apresentaram-se mais distribuídos entre os valores positivos de PC2. Enquanto as fêmeas se distribuíram mais homogeneamente entre os valores tanto positivos quanto negativos. (Figura 14).

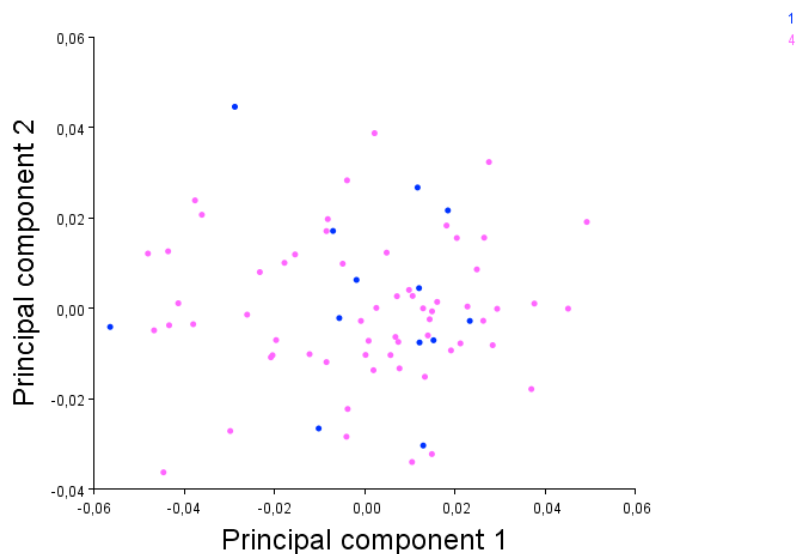


Figura 14: Análise de Componente Principal da carapaça de filhotes natimortos de *C. caretta*. Após a sobreposição das coordenadas procrustes, gerou-se essa distribuição dos sexos, onde os machos são representados pelos pontos azuis e as fêmeas pelos pontos rosas. Observou-se que há uma sobreposição entre os sexos, evidenciando que não houve uma separação total entre esses, porém os machos apresentaram uma tendência aos valores positivos de PC2.

Quando foi avaliado apenas PC1, foi possível observar que a maior variação dentro da amostra ocorreu na região onde se localizam as placas vertebrais, tendendo ao alargamento de toda essa região (PC1 positivo), assim como ocorreu na região caudal (Figura 15A e B).

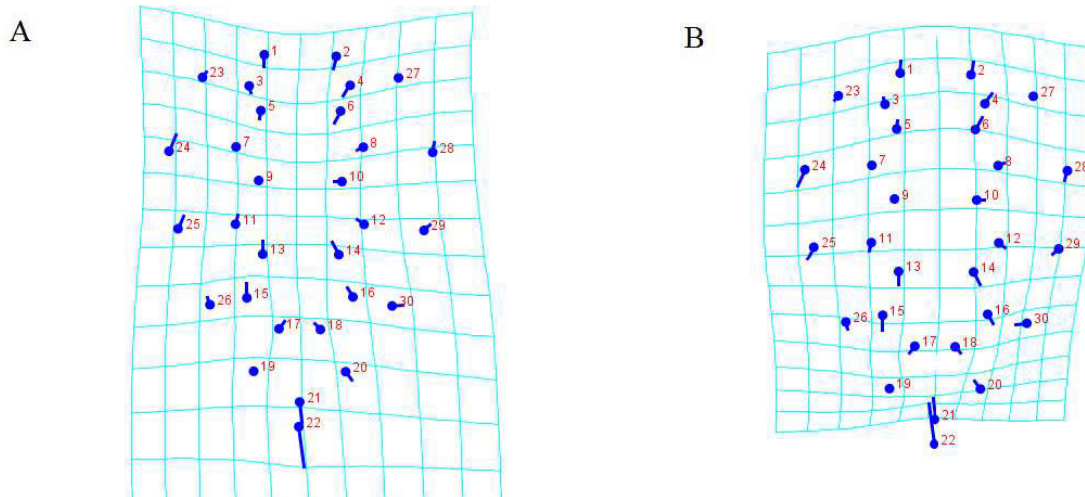


Figura 15: Grade de deformação baseada nos valores de PC1, com vetores indicando o sentido da deformação. Figura A representa os valores positivos de PC1 enquanto a figura B representa os valores negativos. É possível observar uma deformação na região da carapaça onde se localizam as placas vertebrais tendendo ao alargamento de toda essa área, assim como na região caudal dos filhotes de *C. caretta*. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.

Quando foram observados somente os resultados de PC2, notaram-se resultados semelhantes ao de PC1 para a região vertebral, com tendência ao alargamento, especialmente na área entre a terceira e quarta placas vertebrais (Figura 16A). Nesse caso, os machos apresentaram a região caudal com tendência à compressão (Figura 16 B).

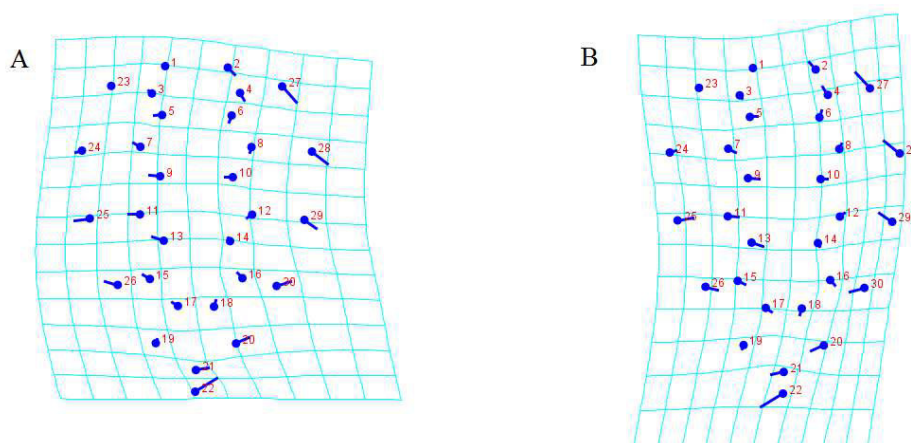


Figura 16: Grade de deformação gerada a partir de PC2, com vetores indicando o sentido da deformação na carapaça. Figura A representa os valores positivos de PC2 enquanto a figura B representa os valores negativos. Em A é visível o alargamento da região vertebral, com todas as placas vertebrais tendendo a alargar-se, exceto o último par, que assim como a região caudal, tendeu ao achatamento. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.

O teste de função discriminante não mostrou resultado que comprove haver diferença entre machos e fêmeas ($p > 0.001$) (Figura 17).

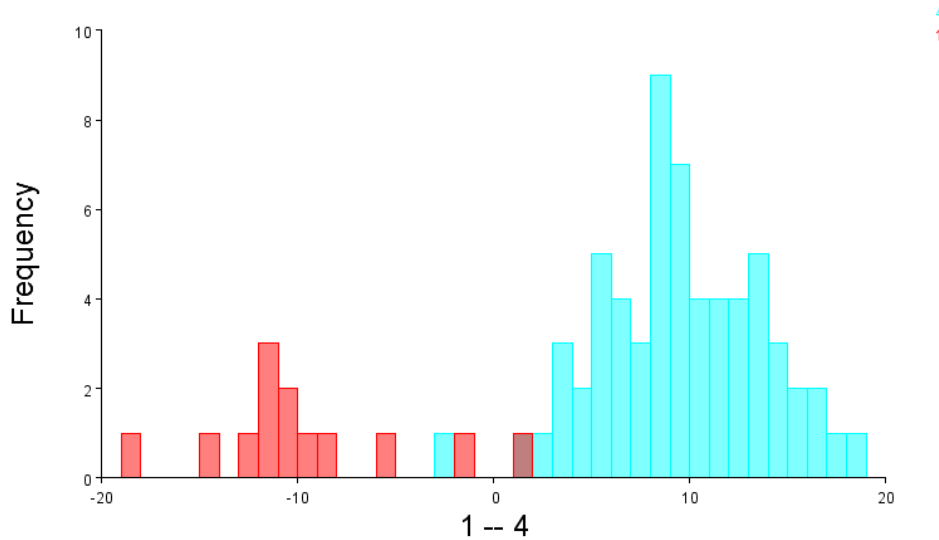


Figura 17: Distribuição dos sexos gerada após a análise de função discriminante, que foi amplificada em 10 vezes, para enfatizar a diferença entre os grupos. As barras azuis representam os machos e as barras vermelhas representam as fêmeas. 1-4 corresponde aos grupos aos quais as amostras foram comparadas.

Assim como na análise da carapaça dos filhotes, foi aplicado o teste de PCA também nos dados originados através das imagens do plastrão, e se verificou que o componente principal 1 (PC1) explicou 47,08% da variação da forma e o componente principal 2 (PC2) explicou 11,82%. Da mesma forma que na análise da carapaça do mesmo Estado, os machos apresentaram-se mais distribuídos entre os valores positivos de PC2. Enquanto as fêmeas se distribuíram mais homogeneamente entre os valores tanto positivos quanto negativos. Também não foi possível observar a separação dos grupos de machos e de fêmeas (Figura 18).”

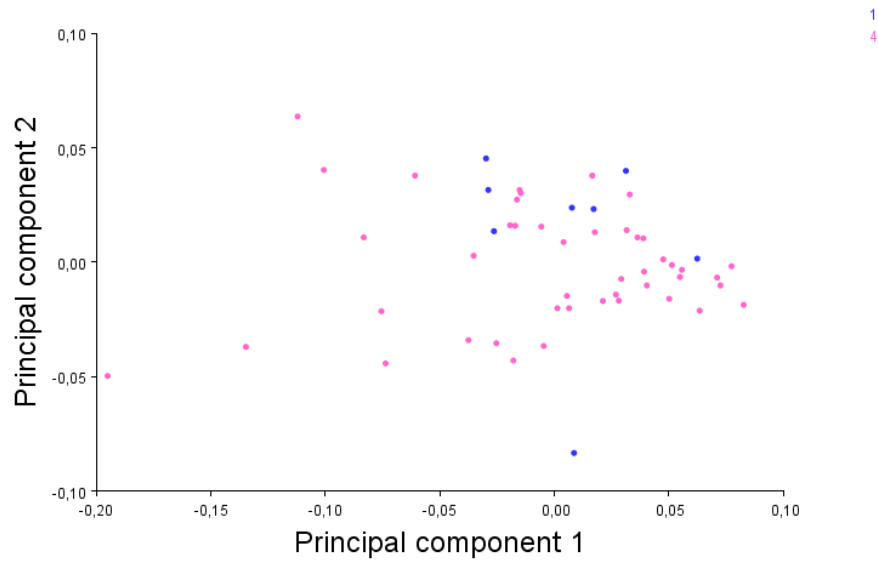


Figura 18: Análise de Componente Principal do plastrão de filhotes natimortos de *C. caretta*. Após a sobreposição das coordenadas procrustes do plastrão, gerou-se essa distribuição dos sexos, onde os machos são representados pelos pontos azuis e as fêmeas pelos pontos rosas. Observou-se que há uma sobreposição entre os sexos, assim como houve na análise da carapaça evidenciando que não houve uma separação total entre esses, com os machos se distribuindo mais entre os valores positivos de PC2.

Quando somente PC1 foi analisado, observou-se uma tendência ao alargamento do plastrão de modo geral (Figura 19A), em especial quando se avaliou os valores negativos de PC1 (Figura 19B).

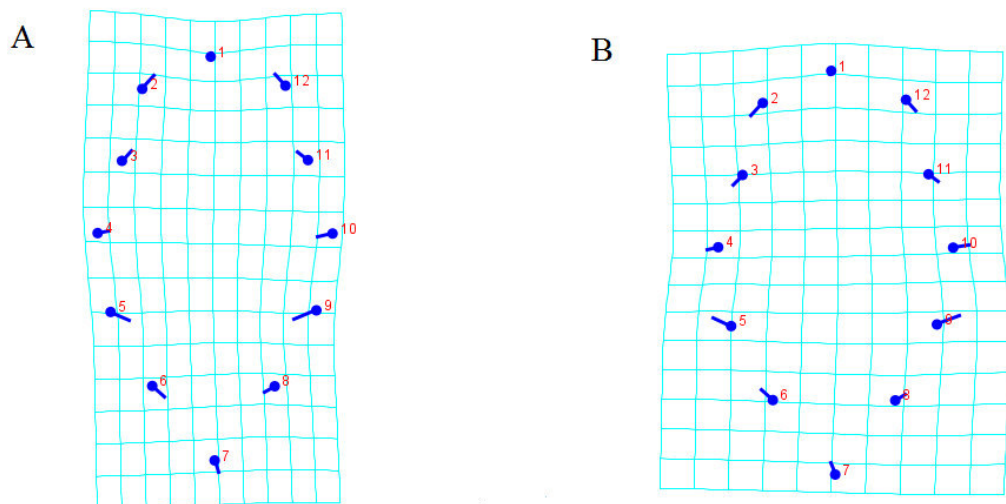


Figura 19: Grade de deformação gerada a partir de PC2, com vetores indicando o sentido da deformação na carapaça. Figura A representa os valores positivos de PC1 enquanto a figura B representa os valores negativos. Em A é visível um discreto alargamento da região abdominal. Em B, esse alargamento já é mais perceptível, na mesma região da placa abdominal. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.

Quando foram observados somente os resultados de PC2, notou-se novamente uma tendência para o achatamento, na mesma região evidenciada em PC1, porém com maior destaque para a região da placa abdominal (Figura 20).

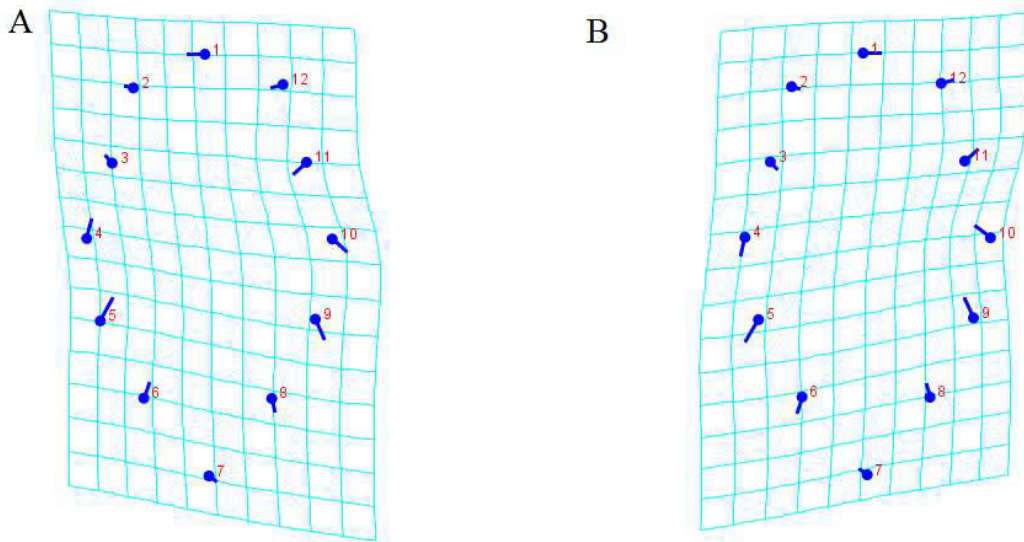


Figura 20: Grade de deformação gerada a partir de PC2, com vetores indicando o sentido da deformação na carapaça. Figura A representa os valores positivos de PC2 enquanto a figura B representa os valores negativos. Em A é visível um discreto achatamento da região abdominal. Em B, esse achatamento já é mais perceptível, na mesma região da placa abdominal. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.

A análise de função discriminante não demonstrou haver diferença entre a forma do plastrão e o sexo dos espécimes de *C. caretta* ($p > 0.0001$) (Figura 21) oriundos do estado da Bahia.”

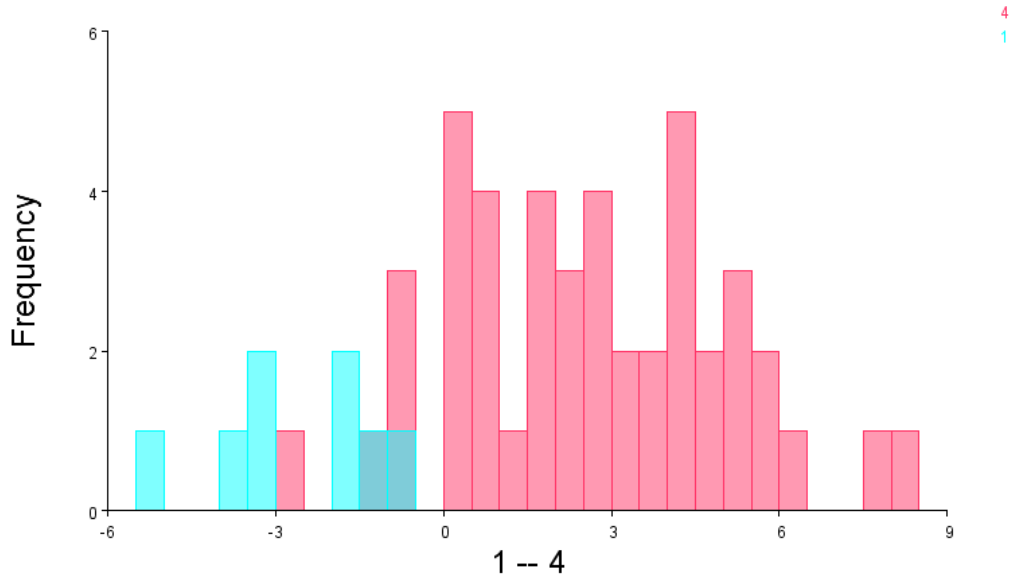


Figura 21: Distribuição dos sexos gerada após a análise de função discriminante, que foi amplificada em 10 vezes, para enfatizar a diferença entre os grupos. As barras azuis representam os machos e as barras vermelhas representam as fêmeas. Houve uma pequena sobreposição dos grupos, com as fêmeas tendendo a formar um padrão separado. 1-4 corresponde aos grupos aos quais as amostras foram comparadas.

Os mesmos testes foram aplicados nas amostras coletadas no estado do Espírito Santo e o PCA da carapaça dos filhotes apresentou como resultado 18,81% para PC1 e 13,95% para PC2. Nesse caso também houve sobreposição entre os grupos (Figura 22).

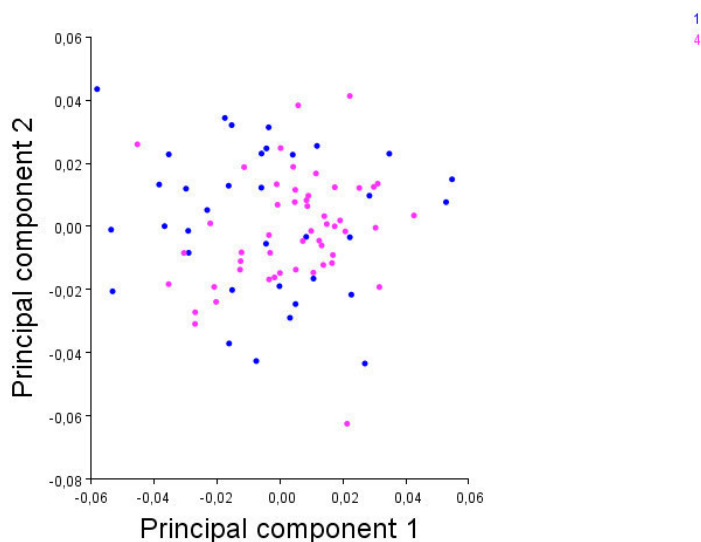


Figura 22: Análise de Componente Principal da carapaça de filhotes natimortos de *C. caretta*. Após a sobreposição das coordenadas procrustes, gerou-se essa distribuição dos sexos, onde os machos são representados pelos pontos azuis e as fêmeas pelos pontos rosas. Observou-se que há uma sobreposição entre os sexos, evidenciando que não houve uma separação total entre esses, que não há um padrão definido para cada um dos sexos.

Quando foi avaliado apenas PC1, foi possível observar uma leve deformação na região do segundo par de placas laterais, tendendo ao achatamento dessa região (Figura 23A). Quando os valores negativos de PC2 foram avaliados, a maior deformação ocorreu na região caudal, que também se achatou (Figura 23B).

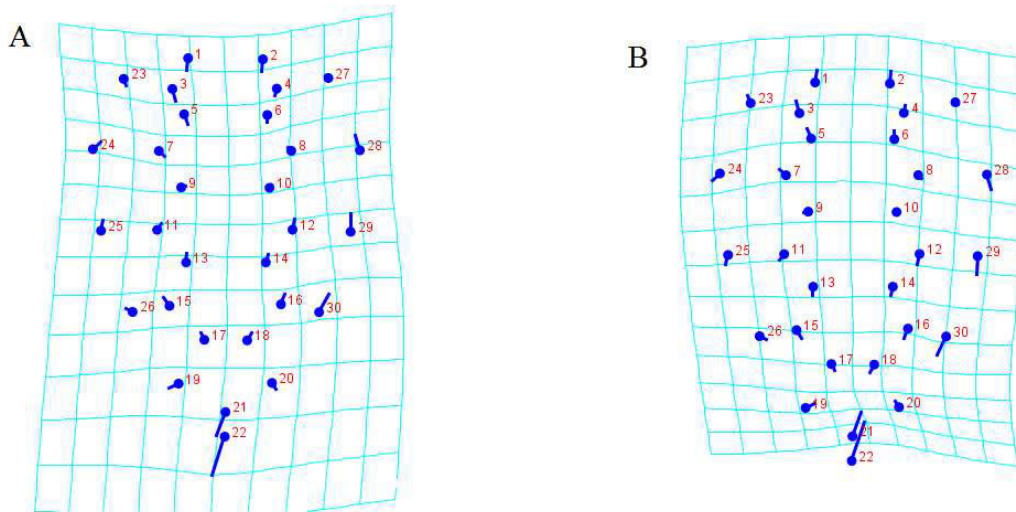


Figura 23: Grade de deformação gerada a partir de PC1, com vetores indicando o sentido da deformação na carapaça. Figura A representa os valores positivos de PC1 enquanto a figura B representa os valores negativos. Em A é possível observar uma leve deformação na região do segundo par de placas laterais, tendendo ao achatamento dessa região. Em B, quando avaliado os valores negativos de PC1, a maior deformação ocorreu na região caudal, que também se achatou. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.

Quando foram observados somente os resultados de PC2, notou-se um achatamento da região caudal (Figura 24A) e uma leve deformação no último par de placas laterais, que também se achatou (Figura 24B).

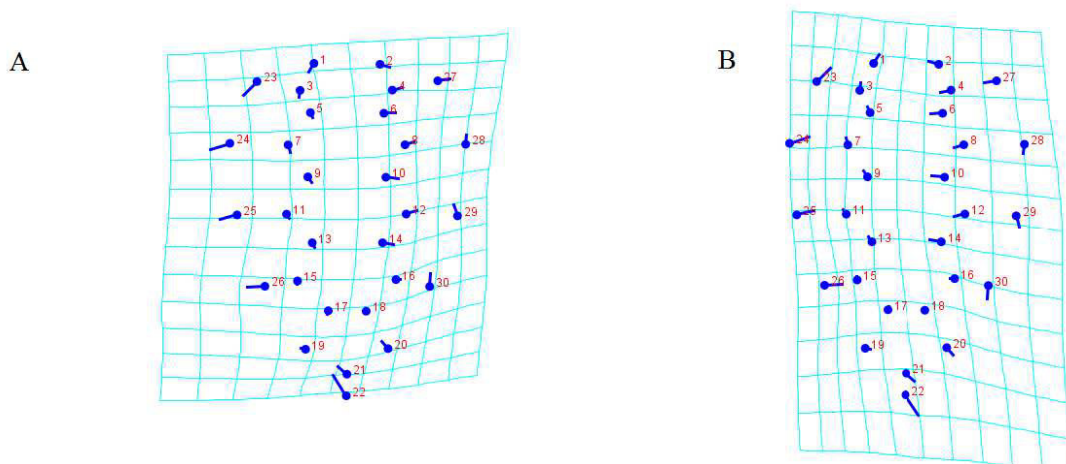


Figura 24: Grade de deformação gerada a partir de PC2, com vetores indicando o sentido da deformação na carapaça. Figura A representa os valores positivos de PC2 enquanto a figura B representa os valores negativos. Foi possível notar-se um achatamento da região caudal quando avaliados os valores positivos de PC2 (A) e uma leve deformação no último par de placas laterais, que também se achatou, quando apenas os valores negativos de PC2 (B) foram avaliados. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.”

A análise de função discriminante não demonstrou haver diferença entre a forma da carapaça e o sexo dos exemplares ($p > 0.0001$) (Figura 25).

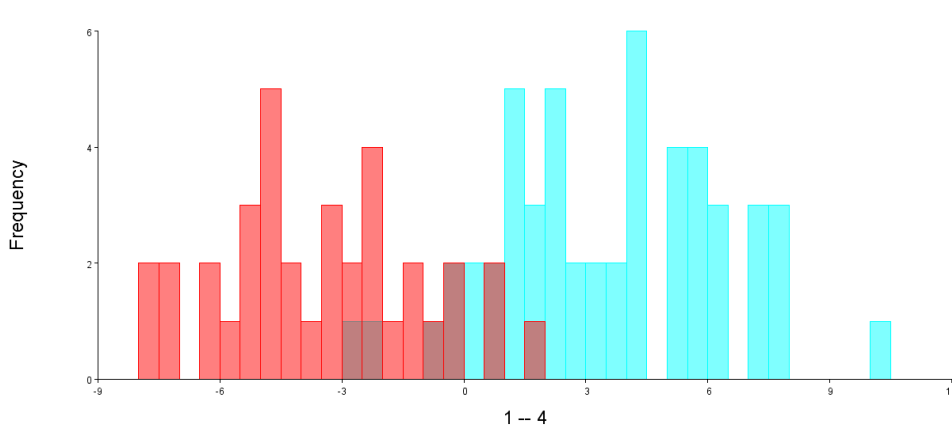


Figura 25: Distribuição dos sexos gerada após a análise de função discriminante, que foi amplificada em 10 vezes, para enfatizar a diferença entre os grupos. As barras azuis representam as fêmeas e as barras vermelhas representam os machos. Houve sobreposição dos grupos. 1-4 corresponde aos grupos aos quais as amostras foram comparadas.

Quando analisados os dados gerados a partir das imagens do plastrão dos filhotes, o teste da PCA verificou que o PC1 explicou 34,86% da variação da forma e o PC2 explicou 20,15%. Não foi possível visualizar a separação de dois grupos distintos (Figura 26).

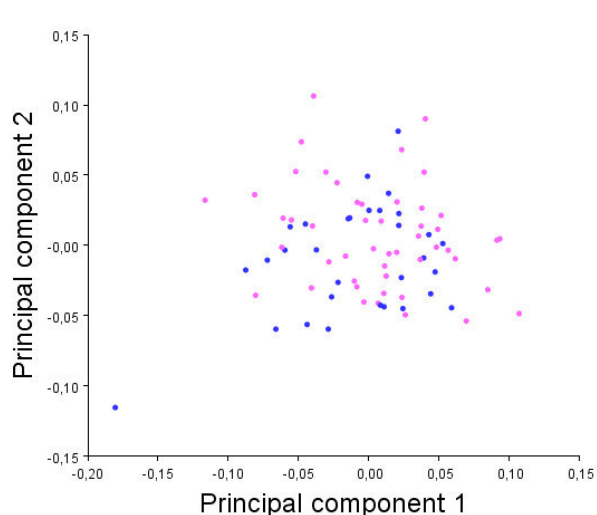


Figura 26: Análise de Componente Principal do plastrão de filhotes natimortos de *C. caretta*. Após a sobreposição das coordenadas procrustes, gerou-se essa distribuição dos sexos, onde os machos são representados pelos pontos azuis e as fêmeas pelos pontos rosas. Observou-se que há uma sobreposição entre os sexos, evidenciando que não houve uma separação total entre esses.

Quando foi avaliado apenas PC1, foi possível observar uma variação apenas quando avaliado os valores negativos de PC1, que apresentaram um alargamento na região das placas abdominais (Figura 27 A e B).

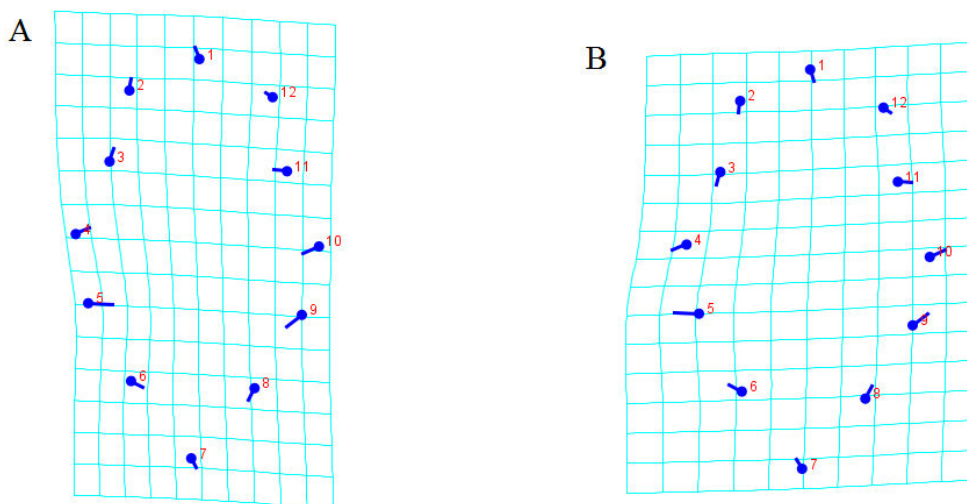


Figura 27: Grade de deformação gerada a partir de PC1, com vetores indicando o sentido da deformação na carapaça. Figura A representa os valores positivos de PC1 enquanto a figura B representa os valores negativos. Foi possível observar uma variação apenas quando avaliado os valores negativos de PC1, que apresentaram um alargamento na região das placas abdominais. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.

Quando foram observados somente os resultados de PC2, também houve maior variação nos valores negativos de PC2, porém com tendência ao alargamento das placas abdominais (Figura 28 A e B).

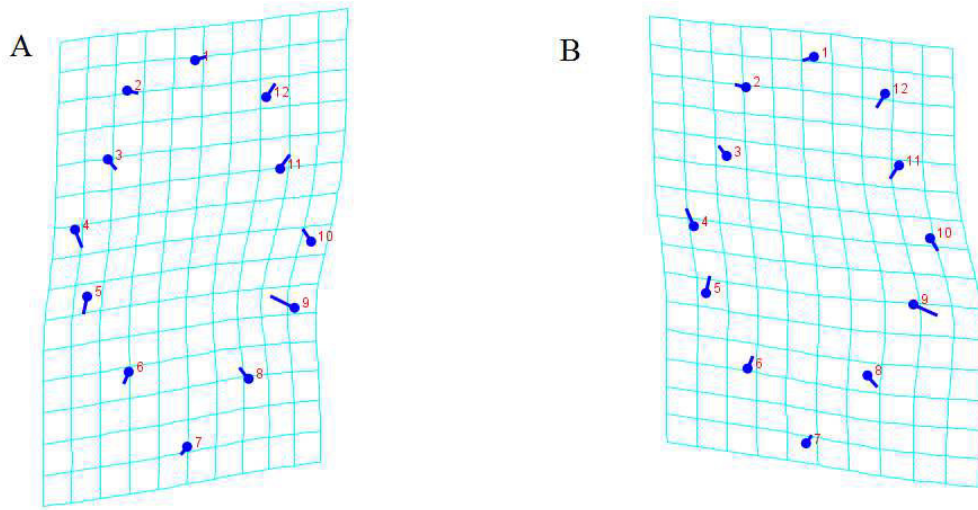


Figura 28: Grade de deformação gerada a partir de PC2, com vetores indicando o sentido da deformação na carapaça. Figura A representa os valores positivos de PC2 enquanto a figura B representa os valores negativos. Assim como em PC1, também houve maior variação nos valores negativos de PC2, porém com tendência ao alargamento das placas abdominais (B). A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.

A análise de função discriminante demonstrou não haver diferença entre a forma do plastrão e o sexo nos espécimes analisados ($p > 0.0001$) (Figura 29).

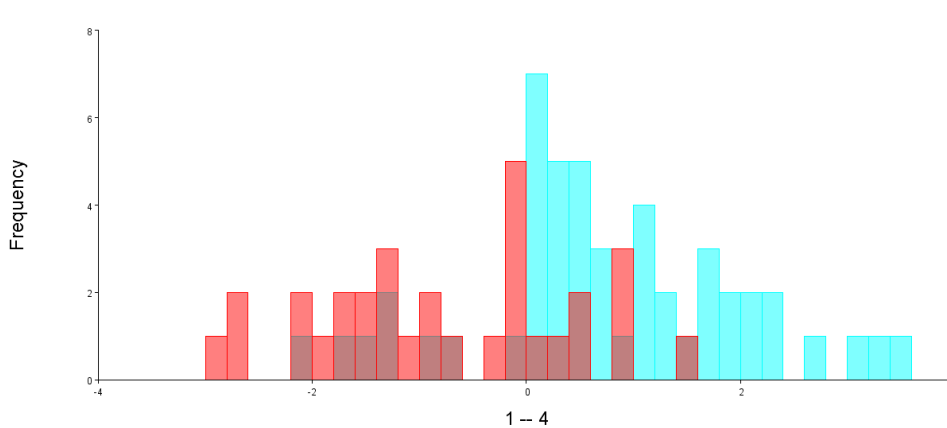


Figura 29: Distribuição dos sexos gerada após a análise de função discriminante, que foi amplificada em 10 vezes, para enfatizar a diferença entre os grupos. As barras azuis representam as fêmeas e as barras vermelhas representam os machos. Nota-se que houve grande sobreposição entre os sexos levando em consideração as medidas amostradas no plastrão dos espécimes do estado do Espírito Santo. 1-4 corresponde aos grupos aos quais as amostras foram comparadas.

Ao comparar a carapaça dos espécimes do estado da Bahia e do estado do Espírito Santo, a PCA apresentou um valor de 20,12% para PC1 e 12,27% para PC2, sem ocorrer separação entre os grupos (Figura 30).

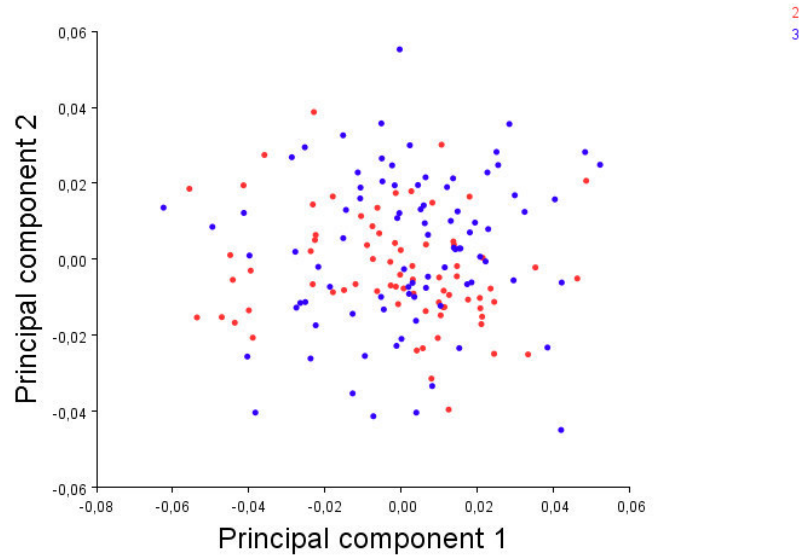


Figura 30: Análise de Componente Principal da carapaça de filhotes natimortos de *C. caretta* dos estados da Bahia e do Espírito Santo. Após a sobreposição das coordenadas procrustes, gerou-se essa distribuição com base na localidade de coleta dos exemplares, no qual os espécimes do Espírito Santo são representados pelos pontos azuis e os espécimes da Bahia são representados pelos pontos vermelhos. Observou-se que há uma sobreposição entre as duas localidades.

Quando apenas os valores de PC1 foram analisados, observou-se que nos valores positivos de PC1 houve um achatamento dos dois primeiros pares de placas laterais (Figura 31 A). Já quando foi avaliado apenas os valores negativos de PC1, a variação se restringiu apenas a região caudal, que apresentou um achatamento (Figura 31B).

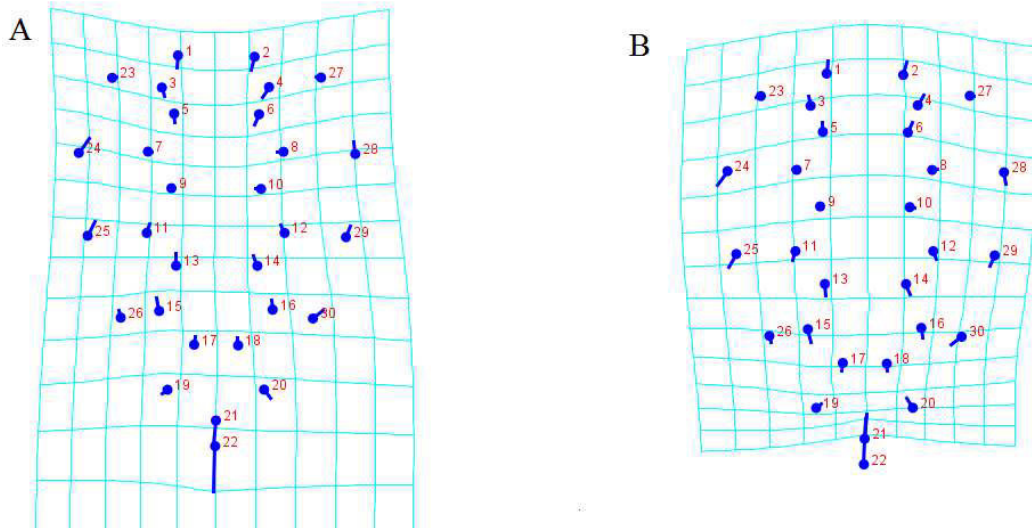


Figura 31: Grade de deformação gerada a partir de PC1, com vetores indicando o sentido da deformação na carapaça. Figura A representa os valores positivos de PC1 enquanto a figura B representa os valores negativos. Foi possível observar em A que houve um achatamento dos dois primeiros pares de placas laterais. Já quando foi avaliada apenas a figura B, a variação se restringiu apenas a região caudal, que apresentou um achatamento. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.

Quando foram observados somente os resultados de PC2, os valores positivos de PC2 (Figura 32 A) mostraram uma tendência ao alargamento das placas laterais e da região caudal. Essas alterações também foram perceptíveis nos valores negativos de PC2 (Figura 32B).

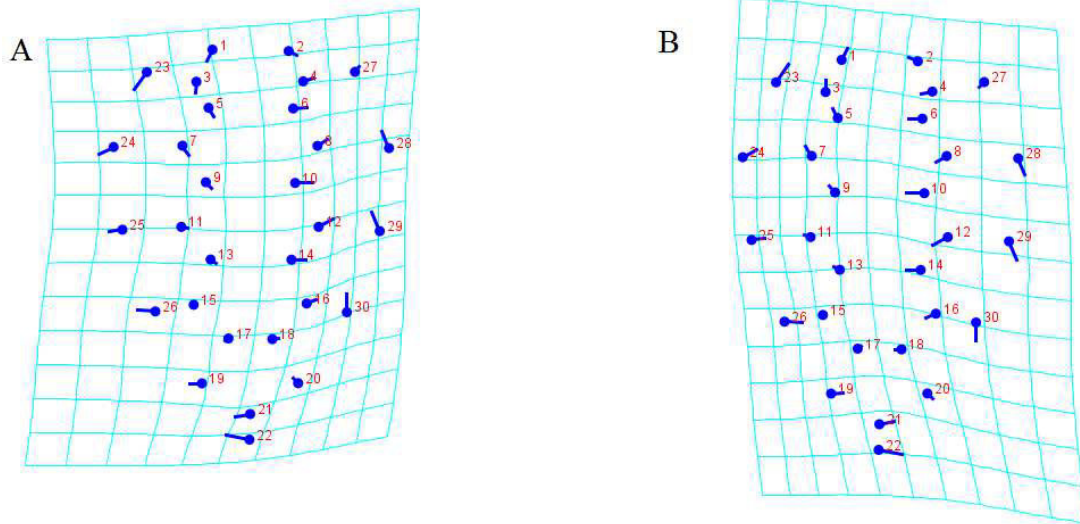


Figura 32: Grade de deformação gerada a partir de PC2, com vetores indicando o sentido da deformação na carapaça. Figura A representa os valores positivos de PC1 enquanto a figura B representa os valores negativos. Em A, pode-se observar uma tendência ao alargamento das placas laterais e da região caudal. Essas alterações também foram perceptíveis nos valores negativos de PC2 (B). A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.

Já a análise de função discriminante confirmou que há diferença entre a carapaça de indivíduos oriundos da Bahia e do Espírito Santo ($p < 0.001$) (Figura 33).

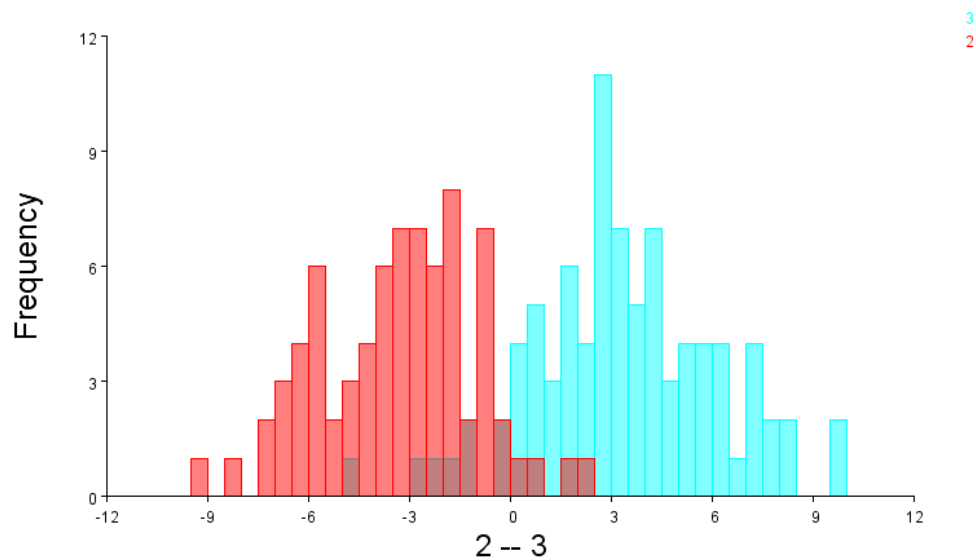


Figura 33: Distribuição dos espécimes dos dois Estados brasileiros, gerada após a análise de função discriminante, que foi amplificada em 10 vezes, para enfatizar a diferença entre os grupos. As barras azuis representam os indivíduos do Espírito Santo e as barras vermelhas representam os da Bahia. 2-3 corresponde aos grupos aos quais as amostras foram comparadas.

As mesmas análises foram realizadas com os dados do plastrão, comparando os dois Estados. Nesse caso, PCA apresentou 38,29% para PC1 e 17,27% para PC2 e também não houve separação entre os grupos (Figura 34).

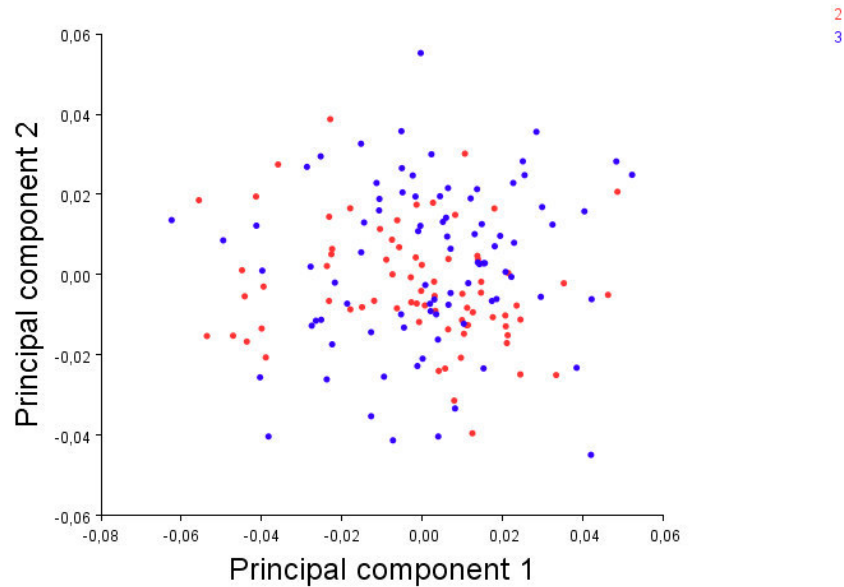


Figura 34: Análise de Componente Principal do plastrão de filhotes natimortos de *C. caretta* dos estados da Bahia e do Espírito Santo. Após a sobreposição das coordenadas procrustes, gerou-se essa distribuição com base na localidade de coleta dos exemplares, no qual os espécimes do Espírito Santo são representados pelos pontos azuis e os espécimes da Bahia são representados pelos pontos vermelhos. Observou-se que há uma sobreposição entre as duas localidades.

Quando apenas os valores positivos de PC1 foram analisados, obteve-se uma variação mínima, o que pode ser percebida pelo gradil de deformação pouco alterado (Figura 35 A). Já quando se avaliou os valores negativos de PC1 foi possível observar as variações ocorridas, que tenderam ao alargamento da região das placas abdominais (Figura 35B).

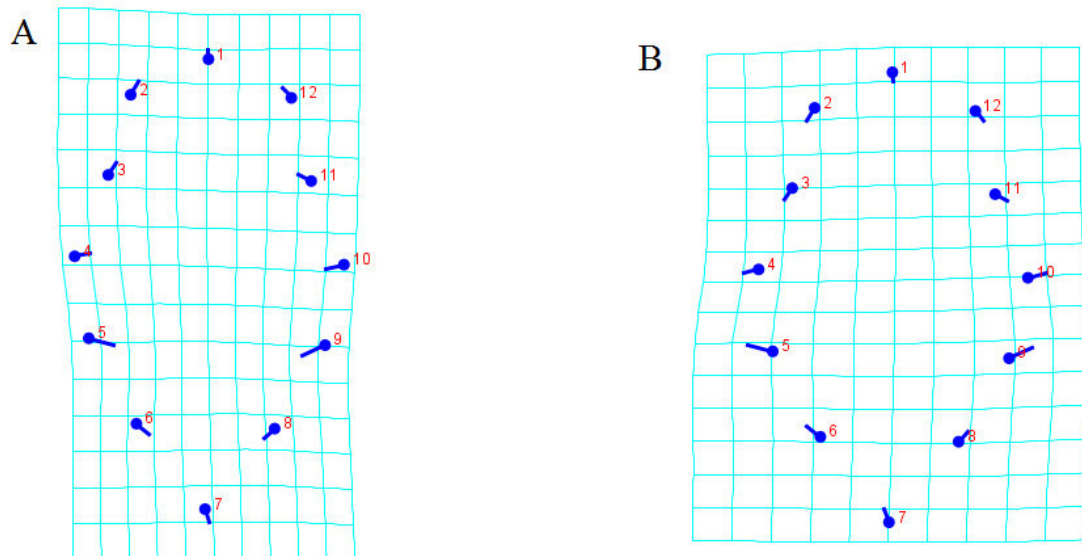


Figura 35: Grade de deformação gerada a partir de PC1, com vetores indicando o sentido da deformação no plastrão. Figura A representa os valores positivos de PC1 enquanto a figura B representa os valores negativos. Em A, pode-se observar que a variação foi muito singela, o que pode ser percebida pelo gradil de deformação pouco alterado. Já em B, foi possível observar as variações ocorridas, que tenderam ao alargamento da região das placas abdominais. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.

Quando apenas os valores, positivos e negativos de PC2 foram analisados, observou-se uma discreta variação, o que pode ser percebida pelo gradil de deformação levemente alterado (Figura 36 A e B).

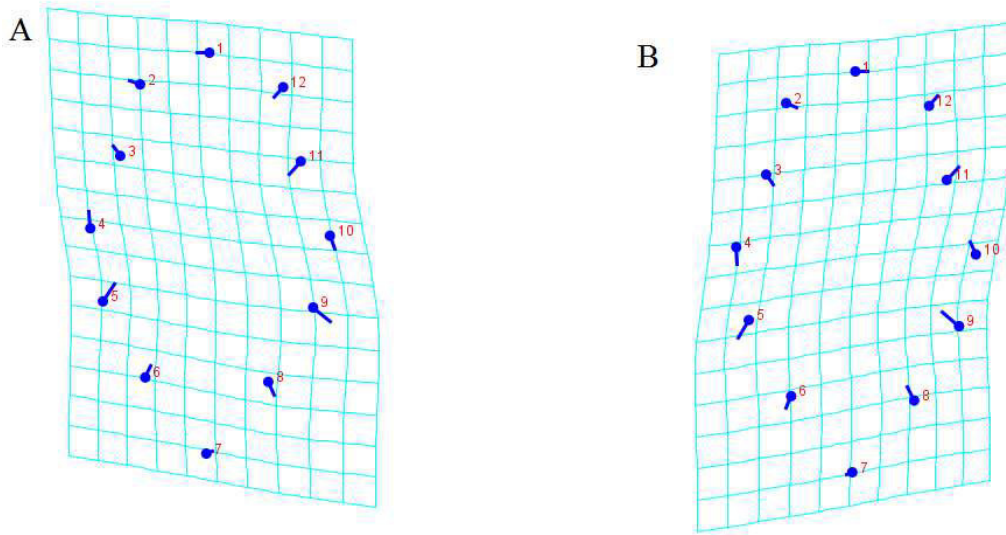


Figura 36: Grade de deformação gerada a partir de PC2, com vetores indicando o sentido da deformação no plastrão. Figura A representa os valores positivos de PC1 enquanto a figura B representa os valores negativos. Em ambas as figuras, deformação registrada foi muito discreta, haja vista o gradil de deformação levemente alterado. A título de localização, a cabeça está voltada para a parte superior da figura.

Já a análise de função discriminante confirmou que há diferença entre o plastrão de indivíduos oriundos da Bahia e do Espírito Santo ($p < 0.001$) (Figura 37).

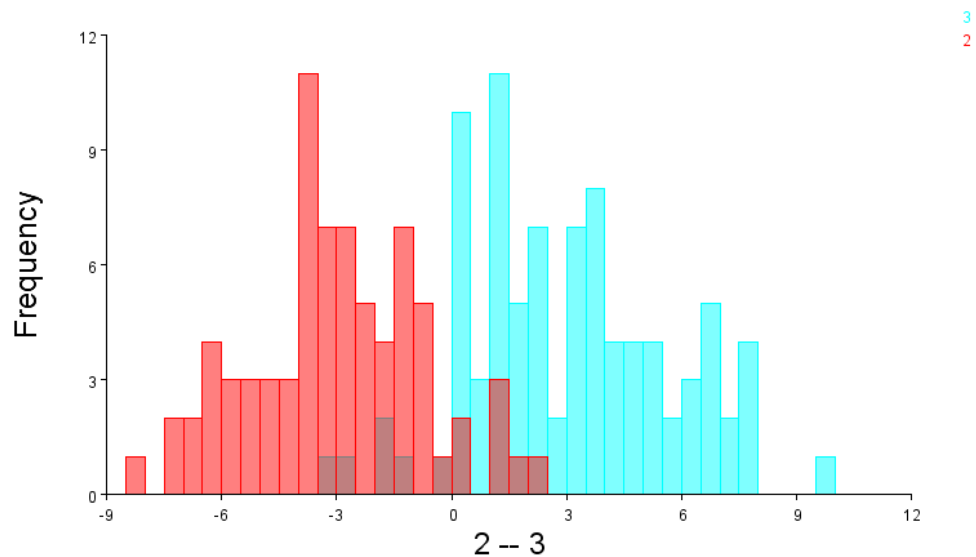


Figura 37: Distribuição dos espécimes dos dois Estados brasileiros, gerada após a análise de função discriminante, que foi amplificada em 10 vezes, para enfatizar a diferença entre os grupos. As barras azuis representam os indivíduos do Espírito Santo e as barras vermelhas representam os da Bahia. 2-3 corresponde aos grupos aos quais as amostras foram comparadas.

5. DISCUSSÃO

Os resultados encontrados para as razões sexuais estimadas das populações tanto do estado do Espírito Santo quanto do estado da Bahia, ambas favoráveis às fêmeas estão de acordo com o que se tem na literatura para a espécie *C. caretta* (Marcovaldi *et al.*, 1997). Um estudo realizado por Mrosovsky & Provancha (1989) identificou que 90% dos filhotes de tartaruga cabeçuda que nascem no estado da Flórida são fêmeas. E 90% dos ninhos que ocorrem no Atlântico Norte estão localizados na Flórida e, dessa forma, se todos os ninhos do norte da Flórida produzirem 100% de machos, ainda assim haverá um viés de mais de 80% favorável as fêmeas em toda a costa leste dos Estados Unidos da América (Shoop *et al.*, 1985).

Isso pode estar relacionado também ao comportamento de filopatria, muito bem documentado para as fêmeas de tartarugas marinhas, que sempre voltam ao local aonde nasceram para desovar (Santos *et al.*, 2011). Marcovaldi *et al.* (1997) relatam que há encontros entre fêmeas de populações norte americanas com machos oriundos de populações brasileiras e que isso pode afetar também a razão sexual dos dois países, uma vez que o contrário também ocorre, mostrando assim que esse revés a favor das fêmeas é um fenômeno bem amplo.

A média das razões sexuais encontrada por Marcovaldi *et al.* (1997) para o estado da Bahia foi 94,3% favoráveis às fêmeas e para o Espírito Santo foi 59,6%. Esses resultados corroboram com os encontrados no presente estudo para a razão sexual mais elevada na Bahia (82% das amostras correspondiam às fêmeas), quando comparado com o estado do Espírito Santo (58% de fêmeas). Mrosovsky & Provancha (1992) também encontraram valores parecidos em dois anos consecutivos de análises realizadas no Estado da Flórida: 94% no ano de 1987 e 87% no ano de 1988. É importante ressaltar que pode haver variações entre uma temporada reprodutiva e outra e que quanto maior o tempo de coleta e mais áreas de desovas englobadas, mais precisa se tornará a aferição dos dados.

Para as análises morfológicas, as características histológicas identificadas foram semelhantes às encontradas por Yntema & Mrosovsky (1980), Miller & Limpus (1981), Malvasio *et al.* (1999, 2012) e Sari & Kaska (2016) para filhotes recém eclodidos. A análise macroscópica das gônadas não deve ser utilizada isoladamente para se definir o sexo de filhotes recém eclodidos da espécie *C. caretta* como sugerido por Yntema & Mrosovsky (1980), Wyneken *et al.* (2007) e Ceriani & Wyneken (2008). Esses autores

descrevem os ovários como estruturas alongadas, apresentando as bordas onduladas, com aspecto serrilhado enquanto os testículos são filiformes e possuem as bordas lisas. As gônadas de *C. caretta* possuem formas dimórficas, assim como as de *C. mydas*, diferentemente de *D. coriacea*, cujas gônadas apresentam-se mais homogêneas. Além disso, os tecidos gonadais dos representantes da família Cheloniidae são opacos, distintos e mais facilmente observados enquanto que em Dermochelidae são translúcidos, com consistência mucosa e de difícil visualização conforme Ceriani & Wyneken (2008).

Wyneken *et al.* (2007) fizeram tanto o estudo histológico quanto o exame laparoscópico em filhotes de *C. caretta*, levando em consideração a sazonalidade das coletas. Eles observaram que para a laparoscopia houve diferença na forma das gônadas, sendo que essas se apresentavam mais robustas no verão e outono e mais finas e lisas no inverno e primavera, mostrando que essa não é uma característica muito confiável. Nas análises histológicas não houve diferença entre os resultados encontrados ao longo de todas as coletas, persistindo a mesma organização histológica tanto para a região cortical quanto para a região medular das gônadas. Esse trabalho também adotou como critério de identificação histológica dos tecidos a composição do revestimento e da medula dos órgãos em questão, corroborando mais uma vez a escolha desse critério de classificação na presente pesquisa.

Técnicas histológicas ou imunocitoquímicas devem ser associadas à laparoscopia ou ao exame macroscópico das gônadas para que se possa garantir com exatidão e precisão a correta sexagem dos animais. O que não ocorre, por sua vez, quando se trata de filhotes muito jovens das espécies *C. mydas* e *D. coriacea*. No primeiro caso, a análise da cor e da forma já permite definir corretamente o sexo dos filhotes na maioria dos casos (RIMBLOT-BALY *et al.*, 1987) e no segundo, o tamanho dos ovários tende a ser menor do que os testículos (WHITMORE *et al.*, 1985). Para filhotes e jovens com comprimento da carapaça inferior a 15 cm não é recomendado o método de mensuração hormonal, uma vez que é necessária a coleta de um elevado volume de sangue, o que pode levar a morte do indivíduo, além das concentrações hormonais nessa idade serem muito baixas, podendo o resultado ser pouco conclusivo (OWENS, 1999).

No entanto Xia *et al.* (2011) realizaram um estudo com filhotes de *C. mydas* e conseguiram mensurar a quantidade de estradiol e testosterona nesses animais. Baseados na proporção “estradiol por testosterona” no corpo dos espécimes, eles verificaram que quando essa é superior a 1,5 os filhotes são fêmeas e quando é inferior,

são machos. Logo, há ainda muita contradição no que diz respeito à mensuração hormonal como ferramenta para a sexagem de filhotes.

Contudo, Ceriani & Wyneken (2008) e Wyneken *et al.* (2007) afirmam que o tamanho, a cor, a textura da superfície e o modo como as gônadas se prendem ao mesentério não são indicadores confiáveis para a definição do sexo de indivíduos nessa idade, independente da espécie em estudo. Porém, no caso de *D. coriacea* e *C. mydas*, os ovários foram proporcionalmente mais longos, sendo este um bom indicador para essas espécies, mas não para *C. caretta*. Portanto, deve-se ressaltar que as análises macroscópicas das gônadas somente devem ser feitas quando correlacionadas com o tamanho do corpo do animal e nunca isoladas conforme sugerido por Wyneken *et al.* (2007) e Ceriani & Wyneken (2008).

Sari & Kaska (2016) realizaram um estudo com natimortos de *C. caretta* oriundos de uma praia do Mediterrâneo. Nesse trabalho, eles fizeram um estudo tanto histológico quanto imunohistoquímico para avaliarem as gônadas e os ductos paramesonéfricos dos exemplares e assim como no presente estudo, foram identificados os ovários e os testículos pela análise da região cortical e medular, com as fêmeas apresentando a região cortical bem desenvolvida nos ovários e pobremente desenvolvida nos testículos.

Uma estrutura geralmente citada em trabalhos de histologia do sistema reprodutor é o oviduto, que segue lateralmente ao ovário e ao rim e possui forma tubular semelhante ao observado por Yntema & Mrosovsky (1980). No presente estudo, esta estrutura não foi, de forma inequívoca, identificada. Apenas foi observado, em raros exemplares, estruturas tubulares que podem representar formas imaturas de oviduto. Embora vários níveis de corte tenham sido realizados, na tentativa de melhor avaliar e identificar esses possíveis ovidutos, não foi possível fazê-lo.

Para *Trachemy dorbignyi* (Dumeril & Bibron, 1835) (Testudines, Emydidae) a análise macroscópica também foi efetiva na determinação do sexo de filhotes, conforme Malvasio *et al.* (1999), onde os filhotes foram avaliados em dois grupos distintos: indivíduos com até seis meses de vida e indivíduos com até um ano de idade. Ficou constatado que há pouca diferença entre um estágio e outro. Essas diferenças foram melhores percebidas nas análises macroscópicas, porém, ao analisar os testículos nas duas faixas etárias somente um indivíduo entre seis meses e um ano apresentou oviduto remanescente muito pouco diferenciado, com tecido prismático simples e os ovários dos animais nessa faixa já possuíam inúmeros ovócitos pequenos e arredondados. Nesse

caso, devido aos padrões anatômicos bastante característicos pra cada gônada, a presença ou não do oviduto foi irrelevante para a classificação sexual dos exemplares de *T. dorbignyi*, assim como no presente trabalho.

Mrosovsky & Benabib (1990) realizaram um trabalho a fim de avaliar dois métodos de sexagem de filhotes de tartarugas: a histologia convencional e a utilização de glicerina para envolver o material e torná-lo transparente, sendo este último método mais barato e rápido do que o primeiro. Os critérios utilizados para diferenciar o sexo na presente pesquisa foram os mesmos utilizados e sugeridos por Yntema & Mrosovsky (1980): presença, na região medular, de túbulos seminíferos imaturos nos machos e epitélio germinativo no córtex das fêmeas. Os resultados encontrados no presente estudo com *C. caretta* foram diferentes para os dois métodos, sendo que o da glicerina necessitou de muita atenção no momento da fixação e na escolha da coleta de material, uma vez que as gônadas podem ficar transparentes demais e dessa forma, não evidenciaram estruturas essenciais para a determinação do sexo, principalmente no caso dos machos.

A morfometria geométrica não se mostrou uma ferramenta aplicável nos estudos realizados com a finalidade de diminuir a utilização ou aperfeiçoar os métodos tradicionais de sexagem de espécimes imaturos de *Caretta caretta*. As análises feitas com a morfometria geométrica não revelaram diferença na carapaça dos filhotes. No entanto, quando foi verificado se existe diferença entre a carapaça e plastrão dos espécimes das duas localidades, a análise de função discriminante mostrou que há diferença entre as populações dos dois locais de coleta. Diferentes abordagens podem ser realizadas utilizando-se os dados gerados pela morfometria geométrica, como pôde ser visto em Valenzuela *et al.* (2004), Depecker *et al.* (2006) e Ferreira-Júnior *et al.* (2011).

Estudos recentes de genética molecular realizados por Reis *et al.* (2010), baseados em DNA mitocondrial, mostraram que a população brasileira de *Caretta caretta* é distinta das demais populações conhecidas no mundo, e se divide em duas sub-populações: uma que ocorre no nordeste (em praias do estado da Bahia e do estado de Sergipe) e uma no sudeste (em praias do estado do Rio de Janeiro e do estado do Espírito Santo). Os autores detectaram um elevado fluxo gênico entre as sub-populações (Rio de Janeiro – Espírito Santo e Bahia – Sergipe). Esse fato pode ser um dos fatores que explicam as diferenças encontradas pela morfometria geométrica na carapaça e no plastrão das populações avaliadas nesse estudo.

Reis *et al.* (2010) também observaram que a diversidade genética diminui do norte para o sul, o que sugere que a colonização dos locais de ocorrência dessa espécie segue do norte para o sul ao longo da costa brasileira, provavelmente influenciado por uma corrente quente que flui do norte para o sul.

Há ainda a ocorrência de alto índice de hibridismo entre a tartaruga cabeçuda e *Lepidochelys olivacea* em Sergipe (Reis *et al.*, 2010) e *Eretmochelys imbricata* (Lara-Ruiz *et al.*, 2006) na Bahia. Esse último trabalho foi realizado em dois municípios vizinhos ao local de coleta desse estudo na Bahia, o que indica que essa hibridização também pode estar ocorrendo em Sítio do Conde, entretanto, estudos genéticos devem ser realizados na área, uma vez que os espécimes podem apresentar o fenótipo de uma espécie com o haplótipo de outra.

No presente estudo, a análise de função discriminante confirmou haver diferença na forma da carapaça e plastrão de filhotes recém nascidos da tartaruga cabeçuda originárias da Bahia e do Espírito Santo, ainda que essas diferenças não sejam observáveis sem a ajuda de ferramentas tecnológicas. Dessa forma, essa abordagem deve ser levada em consideração em outros estudos, pois diminui o número de exemplares a serem eutanasiados, além de permitir outras maneiras para a confirmação do sexo em répteis, como o tempo e/ou a temperatura de incubação como comprovado por Wyneken *et al.* (2007) e Ferreira-Júnior *et al.* (2011).

Valenzuela *et al.* (2004) fizeram uso dessa análise para tentar estimar os sexos de duas espécies de tartarugas de água doce, *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) e *Chrysemys picta* (Schneider, 1783) (Testudines, Emydidae). Eles realizaram três abordagens diferentes, com os dados gerados pela análise de morfometria geométrica, e os resultados do teste de função discriminante apresentaram maior grau de concordância: 90% e 98%, respectivamente, para o sexo dos filhotes, quando comparados com a regressão múltipla (77% e 78% respectivamente) e o teste K-means (69% para *P. expansa* e 61% *C. picta*). Neste trabalho, o sexo dos filhotes foi anteriormente verificado através de radioimunoensaios ou exame macroscópico das gônadas.

Chiari & Claude (2011) também utilizaram a morfometria geométrica para avaliar a forma da carapaça de duas linhagens de tartarugas de Galápagos. Eles observaram que existe diferença na carapaça e na média do tamanho das duas populações e que essa diferença pode estar relacionada com a taxa de crescimento alométrico. Além disso, houve diferença entre os sexos e essa foi semelhante entre as

linhagens. Esses autores não souberam afirmar quais fatores explicariam as diferenças morfológicas encontradas e sugerem que apenas um estudo mais amplo envolvendo a filogenia de tartarugas extintas e ainda existentes poderia ajudar a elucidar essa questão.

Estudo realizado por Ferreira-Júnior *et al.* (2011), com filhotes de tartaruga cabeçuda, demonstrou 84,7% de acerto no tempo de incubação dos filhotes, quando comparada apenas a forma da carapaça e 77,4% de acerto, levando-se em consideração apenas a forma do plastrão, com valores de PC1 de 28% e de PC2 de 14%. Nesse trabalho, foi comparado o tempo de incubação dos filhotes, sendo considerados de rápida incubação os filhotes que eclodiram com menos de 55 dias e de longa incubação os que eclodiram com mais de 70 dias. Foi verificado que filhotes que ficaram incubados por mais tempo apresentaram a carapaça comprimida na região cranial e a região anal era mais ampla e longa, quando comparada com a carapaça dos filhotes que ficaram menos tempo incubados na areia. Os resultados da análise de função discriminante também foram significativos, evidenciando que há diferença tanto na carapaça quanto no plastrão dos filhotes com diferentes tempos de incubação. Dessa forma, os resultados encontrados na presente pesquisa para as diferenças entre populações também corrobora a análise de função discriminante como uma ótima ferramenta a ser utilizada em estudos de morfometria geométrica.

Ceballos & Valenzuela (2011) estudaram o dimorfismo sexual e sua plasticidade na espécie *Chelydra serpentina* (Linnaeus, 1758) (Testudines, Chelydridae), coletando no total 671 ovos, de duas localidades diferentes do estado de Iowa, EUA, e que foram incubados, em laboratório, sob três temperaturas diferentes: 26°C, 28°C e 31°C. Para verificação do sexo dos filhotes foram feitos exames de laparoscopia e mensuração de testosterona. Os filhotes foram acompanhados desde o nascimento até completarem 15,5 meses de vida e durante esse período, a cada seis meses, foram feitas digitalizações da carapaça e do plastrão dos espécimes. Houve diferença na carapaça e plastrão dos exemplares tanto quando eram recém nascidos como quando estavam com 15,5 meses de idade, sendo que os machos apresentaram a carapaça mais larga e mais alongada do que a das fêmeas, diferente deste estudo, cujos filhotes fêmeas de tartaruga cabeçuda apresentaram um estreitamento da carapaça, tanto na parte posterior quanto anterior do corpo.

No trabalho de Ferreira-Júnior *et al.* (2011) o tempo de incubação foi um dos fatores responsáveis pela diferença na forma dos exemplares amostrados e, assim como no presente estudo, o sexo pode responder por uma pequena parte das diferenças

encontradas entre os espécimes. Novos estudos, com abordagens distintas e em diferentes espécies devem ser realizados, de modo a corroborar os resultados apresentados pela morfometria geométrica.

Dessa forma, em se tratando de um estudo no qual os exemplares não tiveram suas condições biológicas monitoradas ou manipuladas em laboratório, não foi possível estimar a quanto tempo os espécimes já estavam soterrados e como isso afetou a qualidade das amostras coletadas. Por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção, a opção de incubar os ovos em laboratório, em temperaturas controladas, para posteriormente eutanasiar os filhotes recém eclodidos não foi cogitada, o que de fato, acarretou em alguns prejuízos na obtenção dos dados.

Fica mais uma vez evidenciada a importância do estudo histológico como ferramenta para estudos relacionados com o sistema reprodutor de filhotes da espécie *C. caretta*, pois esta apresenta resultados mais específicos. Por serem muito imaturos sexualmente, a melhor forma de diferenciar as gônadas dos filhotes é através da análise do córtex e medula dos órgãos, que apresentam diferenças consistentes.

Conclusões

- As populações brasileiras de tartarugas da espécie *Caretta caretta* apresentam razão sexual favorável as fêmeas, tanto no estado da Bahia quanto no estado do Espírito Santo;
- A análise de morfometria geométrica deve ser mais explorada pelos estudiosos e estendida a outras populações, pois além de ser um método não invasivo, é barato e de fácil aplicação, muito eficiente e com grande aplicabilidade em planos de manejo e conservação de populações.
- A histologia se apresentou, ainda, como a melhor ferramenta para a identificação do sexo de indivíduos muito jovens da espécie *C. caretta*.

Referências Bibliográficas

- BJORNDAL, K. A. 1997. Foraging ecology and nutrition of sea turtles. *In*: LUTZ, P. L. & MUSICK, J. A. (ed). **The Biology of sea turtles**. CRC Press. 199-231p.
- BOLTEN, A. B. 2003. 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. 63-78p.
- BOOKSTEIN, F. L. 1991. **Morphometric tools for landmark data: Geometry and Biology**. Cambridge University Press: New York.
- BULL, J. J. & VOGT, R. C. 1981. Temperature-sensitive periods of sex determination in emydid turtles. **Journal of Experimental Zoology**. 218: 435-40.
- BULMER, M. 1994. **Theoretical evolutionary ecology**. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- CARVALHO, R. H., LACERDA, P. D., MENDES, S. S., BARBOSA, B. C., PASCHOALINI, M., PREZOTO, F. & SOUSA, B. M. 2015. Marine debris ingestion by sea turtles (Testudines) on the Brazilian coast: an underestimated threat? **Marine Pollution Bulletin**. 101: 746-749
- CEBALLOS, C. P. & VALENZUELA, N. 2011. The Role of Sex-specific plasticity in shaping sexual dimorphism in a long-lived vertebrate, the snapping turtle *Chelydra serpentina*. **Evolutionary Biology**. 38:163-181.
- CERIANI, S. A. & WYNEKEN, J. 2008. Comparative morphology and sex identification of the reproductive system in formalin-preserved sea turtle specimens. **Zoology**. 111: 179-187.
- CHIARI, Y & CLAUDE, J. 2011. Study of the Carapace Shape and Growth in Two Galápagos Tortoise Lineages. **Journal of Morphology**. 272: 379-386.
- DEPECKER, M., BERGE, C., PENIN. X. & RENOUS, S. 2006. Geometric morphometrics of the shoulder girdle in extant turtles (Chelonii). **Journal of Anatomy**. 208: 35-45.
- DODD, C. K. 1998. Synopsis of the biological data on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758). **U.S. Biological Report**. 88-14.
- ERNST, C. H. & BARBOUR, W. 1989. **Turtles of the world**. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- EWERT, M. A. & NELSON, C. E. 1991. Sex determination in turtles: diverse patterns and some possible adaptive values. **Copeia**. 1: 50-69.

FERREIRA-JÚNIOR, P. D., TREICHEL, R. L., SCARAMUSSA, T.L. & SCALFONI, J.T. 2011. Morphometric pattern in *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) (Cheloniidae) hatchlings from nests with different embryo development rates. **Brazilian Journal of Biology**. 71(1): 151-156.

FERREIRA-JÚNIOR, P.D. 2009. Aspectos ecológicos da determinação sexual em tartarugas. **Acta Amazonica**. 39 (1): 139-154.

GAFFNEY, E. S. & MEYLAN, P.A. 1988. A phylogeny of turtles. *In*: BENTON, M. J. (ed). **The Phylogeny and Classification of Tetrapods**. Clarendon Press. Oxford.

GAUTHIER, J. A, KEARNEY, M., MAISANO, RIEPPEL, O., BEHLKE, A. D. B. 2012. Assembling the Squamate Tree of Life: Perspectives from the Phenotype and the Fossil Record. **Bulletin of the Peabody Museum of Natural History** 53(1).

GEORGES, A., LIMPUS, C. & STOUTJESDIJK. 1994. Hatchlings sex in the marine turtle *Caretta caretta* in determined by proportion of development at temperature, not daily duration of exposure. **The Journal of Experimental Zoology**. 270: 432-444.

GROSS, T. S. CRAIN, D. A., BJORNDAL, K. A., BOLTEN, A. B. & CARTHY, R. R. 1995. Identification of sex in hatchling loggerhead turtles (*Caretta caretta*) by analysis of steroid concentrations in chorioallantoic/amniotic fluid. **General and Comparative Endocrinology**. 99: 204-210.

ICMBio. 2016. Lista nacional oficial de espécies da fauna ameaçadas de extinção. Disponível em <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/avaliacao-do-risco/PORTARIA_N%C2%BA_444_DE_17_DE_DEZEMBRO_DE_2014.pdf>.

Acessado em 06 de janeiro de 2017.

JANZEN, F. J. & KRENZ, J. G. 2004. Phylogenetics: which was first, GSD or TSD? *In*: VALENZUELA, N. & LANCE, V. A. (ed). **Temperature-dependent Sex Determination in Vertebrates**. Smithsonian Books. Washington, DC.

JOYCE, W. G. & GAUTHIER, J. A. 2004. Palaeoecology of Triassic stem turtles sheds new light on turtle origins. **Proceedings of the Royal Society B**. 271: 1-5.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. 2008. **Histologia Básica**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

KAWAGOSHI, T., NISHIDA, C. & MATSUDA, Y. 2012. The origin and differentiation process of X and Y chromosomes of the black marsh turtle

(*Siebenrockiella crassicollis*, Geoemydadae, Testudines). **Chromosome Research**. 20: 95-110.

KLINGENBERG, C. P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. **Molecular Ecology Resources**. 11: 353-357.

LARA-RUIZ, P., LOPEZ, G. G., SANTOS, F. R. & SOARES, L. S. 2006. Extensive hybridization in hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil revealed by mtDNA analyses. **Conservation Genetics**. 7: 773-781.

MALVASIO, A., GOMES, N. & FARIAS, E. C. 1999. Identificação sexual através do estudo anatômico do sistema urogenital em recém-eclodidos e jovens de *Trachemys dorbignyi* (Duméril & Bribon) (Reptilia, Testudines, Emydidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. 16(1): 91-102.

MALVASIO, A., NASCIMENTO-ROCHA, J. M., SANTOS, H. D., ATAÍDES, A. G. & PORTELINHA, T. C. G. 2012. 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.

MANSFIELD, K. L. & PUTMAN, N. F. 2013. Oceanic Habits and Habitats. *Caretta caretta*. In WYNEKEN, J., LOHMANN, K. J. & MUSICK, J. A (ed) **The biology of sea turtles vol III** CRC Press

MARCOVALDI, M. A. & LAURENT, A. 1996. A six season study of marine turtle nesting at Praia do Forte, Bahia, Brazil, with implications for conservation and management. **Chelonian Conservation and Biology**. 2(1): 55-59.

MARCOVALDI, M. A., GODFREY, M. H. & MROSOVSKY, N. 1997. Estimating sex ratios of loggerhead turtles in Brazil from pivotal incubation durations. **Canadian Journal of Zoology**. 75: 755-770.

MARCOVALDI, M. A., LOPES, G. G., SOARES, L. S., LIMA, E. H. S. M., THOMÉ, J. S. A. & ALMEIDA, A. P. 2009. Movimentos migratórios da tartaruga cabeçuda *Caretta caretta* monitorados através de telemetria por satélite. In: **Resumos do IV Congresso Brasileiro de Herpetologia**. SBH/UnB.

MARTINEZ, P. A., EZAZ, T., VALENZUELA, N., GEORGES, A & GRAVES, J. A. M. 2008. An XX/XY heteromorphic sex chromosome system in the Australian chelid turtle *Emydura macquarii*: A new piece in the puzzle of sex chromosome evolution in turtles. **Chromosome Research**. 16:815–825.

- MENDES, S. S., CARVALHO, R. H., FARIA, A. F., SOUSA, B. M. 2015. Marine debris ingestion by *Chelonia mydas* (Testudines:Cheloniidae) on the Brazilian coast. **Marine Pollution Bulletin**. 92: 8 - 10.
- MEYLAN, A. B. & MEYLAN, P. A. 2000. Introducción a la Evolución, Histórias de Vida y Biología de las Tortugas Marinas. *In*: ECKERT, K. L., BJORN DAL, K. A., ABREU-GROBOIS, F. A. & DONNELLY, M. (ed). **Técnicas de Investigación y Manejo para La Conservación de las Tortugas Marinas**. SSC/IUCN Marine Turtle Specialist Group, p.3-5.
- MILLER, J. D. & LIMPUS, C. J. 1981. Incubation period and sexual differentiation in the green turtle *Chelonia mydas* L. *In*: BANKS, C. B. & MARTIN, A. A. (ed). **Proceedings of the Melbourne Herpetological Symposium**, pp. 66–73.
- MITTEROECKER, P. & GUNZ, P. 2009. Advances in Geometric Morphometrics. **Evolutionary Biology**. 36 (2): 235-247.
- MOLEN, S. V. D., ABADIAS, N. M. & GONZALES-JOSÉ, R. 2007. **Introducción a La Morfometría Geométrica: Curso Teórico-Práctico**. Disponível em <<http://www.efn.uncor.edu/departamentos/divbioeco/otras/bioflor/morfometr%EDA/intr oMG.pdf>>. Acessado em: 20/12/2016.
- MONTEIRO, L. R. & REIS, S. F. 1999. **Princípios de Morfometria Geométrica**. Holos. São Paulo
- MROSOVSKY, N. & BENABIB, M. 1990. An assessment of two methods of sexing sex hatchling sea turtles. **Copeia**. 2: 589-591.
- MROSOVSKY, N & PROVANCHA, J. 1989. Sex ratio of loggerhead sea turtles hatchling on Florida Beach. **Canadian Journal of Zoology**. 67: 2533-2539.
- MROSOVSKY, N & PROVANCHA, J. 1992. Sex ratio of hatchling loggerhead sea turtles: data and estimates from a 5-year study. **Canadian Journal of Zoology**. 67: 2533-2539.
- MROSOVSKY, N. DUTTON, P. H. & WHITEMORE, C. P. 1984. Sex ratios of two species of sea turtles nesting in Suriname. **Canadian Journal of Zoology**. 62: 2227-2239.
- OWENS, D. W., HEBDRICKSON, J. R., LANCE, V. A. & CALLARD, P. 1978. A technique for determining sex of immature *Chelonia mydas* using radioimmunoassay. **Herpetologica**. 34: 270-273.
- OWENS, D. W. 1999. Reproductive cycles and endocrinology. *In*: ECKERT, K. L., BJORN DAL, K., ABREU-GROBOIS, F. A. & DONNELLY, M. (ed). **Research and**

Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. SSC/IUCN Marine Turtle Specialist Group, p.119-123.

PIEAU, C. 1996. Temperature variation and sex determination in reptiles. **Bioessay.** 18: 19-26.

PINTO, F. E., BUZIN, A. R., NETO, E. P., FERREIRA, G. B., CASTHELOGE, V. D., FERREIRA-Jr, P. D., ENDRINGER, D. C., ANDRADE, T. U. & LENZ, D. 2015. A hematologic and biochemical profile on 3-month-old hatchlings of *Lepidochelys olivacea*. *Comparative Clinical Pathology*. DOI 10.1007/s00580-015-2075-2

PRITCHARD, P. C. H. & MORTIMER, J. A. 1999. Taxonomy, External Morphology, and Species Identification. *In*: ECKERT, K. L., BJORN DAL, K. A., ABREU-GROBOIS, F. A. & DONNELLY, M. (ed). **Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles.** 1-18p.

REIS, E. C., SOARES, L. S. VARGAS, S. M. SANTOS, F. R., YOUNG, R. J., BJORN DAL, K. A., BOLTEN, A. B. & LÔBO-HADJU, G. 2010. Genetic composition, population structure and phylogeography of loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. **Conservation Genetics.** 11: 1467-1477.

RIMBLOT-BALY, F., LESCURE, J., FRETEY, J. & PIEAU, C. 1987. Sensibilité à la température de la différenciation sexuelle chez la Tortue Luth, *Dermochelys coriacea* (Vandelli 1761); application des données de l'incubation artificielle à l'étude de la sex ratio dans la nature. **Annales des Sciences Naturelles - Zoologie.** 8: 277-290.

RIVERA, G. 2011. Ecomorphological variation in shell shape of the freshwater turtle *Pseudemys concinna* inhabiting different aquatic flow regimes. **Integrative and Comparative Biology.** 48(6): 769-787.

ROHLF, F. J. 2010 a. **TPS Utility Program. Ver. 1.46.** Stony Brook, NY: Department of Ecology and Evolution, Universidade do Estado de Nova Iorque.

_____. 2010 b. **TPSDig. Ver. 2.16.** Stony Brook, NY: Department of Ecology and Evolution, Universidade do Estado de Nova Iorque.

SÁNCHEZ-OSPINA, A. C., RODRIGUEZ, B. & CEBALLOS, C. B. 2014. Histological description of the reproductive system of male and female hatchlings of the Magdalena River turtle (*Podocnemis lewyana*). **Acta Biológica Colombiana.** 19(3):427-435.

SANTOS, A. S., SOARES, L. S., MARCOVALDI, M. A., MONTEIRO, D. S., GIFFONI, B. & ALMEIDA, A. P. 2011. Avaliação do estado de conservação da

tartaruga marinha *Caretta caretta* Linnaeus, 1758 no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**. 1(1): 3-11.

SARI, F. & KASKA, Y. 2016. Histochemical and immunohistochemical studies of the gonads and paramesonephric ducts of male and female hatchlings of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). **Biotechnic & Histochemistry**. 91(6): 428-437.

SCHOCH, R. R. & SUES, H. D. 2015. A Middle Triassic stem-turtle and the evolution of the turtle body plan. **Nature** 523: 584–587

SCHROEDER, B. A., FOLEY, A. M. & BAGLEY, D. A. 2003. Nesting patterns, reproductive migrations, and adult foraging areas of loggerhead turtles. Pp 114-12. *In*: BOLTEN, A. B. & WITHERINGTON, B. E. (ed). **Loggerhead Sea Turtles**. Smithsonian Institution Press.

SHOOP, C. R., RUCKDESCHEL, C. A. & THOMPSON, N. B. 1985. Sea turtles in the southeast United States: nesting activity derived from aerial and ground surveys. **Herpetologica**. 41: 252-259.

STERLI, J. 2010. Phylogenetic relationships among extinct and extant turtles: the position of Pleurodira and the effects of the fossils on rooting crown-group turtles. **Contributions to Zoology**. 79 (3): 93-106

TAMAR. 2009. **Projeto Tamar ICMBio** – Fundação Pró-Tamar. Programa de formação 2009.

The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-3. <www.iucnredlist.org>. Acessado em 05 de Janeiro de 2017.

TOLOSA, E. M. C., RODRIGUES, C. J., BEHMER, O. A. & NETO, A. G.F. 2003. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Editora Manole Ltda. 331 p.

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

VAN DIJK, P. P., IVERSON, J. B., RHODIN, A. G. J., SHAFFER, H. B. & BOUR, R. 2014. Turtles of the World, 7th Edition: Annotated Checklist of Taxonomy, Synonymy, Distribution with maps and conservation Status. **Chelonian Research Monographs** – Number 5

VITT, L. J. & CALDWELL, J. P. 2014. **Herpetology An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. Fourth Edition**. Elsevier

- WHITMORE, C; P. DUTTON & M. MROSOVSKY. 1985. Sexing of Hatching Sea Turtles: Gross Appearance Versus Histology. **Journal of Herpetology**. 19 (3): 430-431.
- WIBBELS, T., OWENS, D. W. & LIMPUS, C. J. 2000. Sexing juvenile sea turtle: is there an accurate and practical method? **Chelonian Conservation and Biology**. 3: 75
- WOOD, J. R., WOOD, F. E., CRITCHLEY, K. H., WILDT, D. E. & BUSH, M. 1983. Laparoscopy on the green sea turtle, *Chelonia mydas*. **British Journal of Herpetology**. 6: 323-327.
- WYNEKEN, J. (2001). **The anatomy of sea turtles**. Jacksonville: NOAA Technical Memorandum MNFS-SEFSC. 470 p.
- WYNEKEN, J., EPPERLY, S. P., CROWDER, L. B., VAUGHAM, J & ESPER, K. B. 2007. Determining sex in posthatchling loggerhead sea turtles using multiple gonadal and accessory duct characteristics. **Herpetologica**. 63: 19–30.
- XIA, Z. R., LI, P. P., GU, H. X., FONG, J. J. & ZHAO, E. M. 2011. Evaluating Noninvasive Methods of Sex Identification in Green Sea Turtle (*Chelonia mydas*) Hatchlings. **Chelonian Conservation and Biology**. 10(1): 117-123.
- YNTEMA, C. L. & MROSOVSKY, N. 1980. Sexual differentiation in hatchling loggerheads (*Caretta caretta*) incubated at different controlled temperatures. **Herpetologica**. 36: 33-36.
- YNTEMA, C. L. & MROSOVSKY, N. 1982. Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. **Canadian Journal of Zoology**. 60: 1012-1016.
- YNTEMA, C. L. 1979. Temperature levels and periods of sex determination during incubation of eggs of *Chelydra serpentina*. **Journal of Morphology**. 159 (1): 17-28.