

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

Sarah da Silva Mendes

**MORFOLOGIA E MORFOMETRIA GEOMÉTRICA PARA ESTIMAR O SEXO DE
FILHOTES DA TARTARUGA MARINHA *Caretta caretta* (LINNAEUS, 1758)
(TESTUDINES, CHELONIIDAE): TECNOLOGIA DA INFORMAÇÃO EM PROL
DA CONSERVAÇÃO**

Juiz de Fora

2013

Sarah da Silva Mendes

Morfologia e morfometria geométrica para estimar o sexo de filhotes da tartaruga marinha *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) (Testudines, Cheloniidae): tecnologia da informação em prol da conservação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Bernadete Maria de Sousa

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Christina Marques Nogueira Castañon

Juiz de Fora

2013

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.

Morfologia e morfometria geométrica para estimar o sexo de filhotes da tartaruga marinha *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) (Testudines, Cheloniidae): tecnologia da informação em prol da conservação / Sarah da Silva Mendes. -- 2013.
49 p. : il.

Orientadora: Bernadete Maria de Sousa

Coorientadora: Maria Christina Marques Nogueira Castañon

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2013.

1. Tartaruga Marinha. 2. *Caretta caretta*. 3. Histomorfologia. 4. Morfometria geométrica. I. Sousa, Bernadete Maria de, orient. II. Castañon, Maria Christina Marques Nogueira, coorient. III. Título.

Morfologia e morfometria geométrica para estimar o sexo de filhotes da tartaruga marinha *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) (Testudines, Cheloniidae): tecnologia da informação em prol da conservação.

SARAH DA SILVA MENDES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovado em 26 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dra. Bernadete Maria de Sousa - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)



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



Prof^ª. Dra Doutora Iara Alves Novelli
Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS)

*Aos meus pais e à minha irmã, fonte de
inspiração e amor! Obrigada por
acreditarem em mim! Esse título é pra 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!

Pai e mãe, obrigada por tudo! Pelo carinho, incentivo, compreensão! Mãe, minha melhor companheira de campo, sempre presente nas aberturas de ninho e na coleta dos filhotes, você tornou tudo muito mais agradável! Pai, maior torcedor e incentivador, comemorando cada vitória e conquista sempre muito orgulhoso!

Marcelinha, minha linda irmã e garota propaganda, sempre divulgando meu projeto para as pessoas do seu convívio, ressaltando como ele era legal e fascinante! Apoiando-me e incentivando quando eu me encontrava estressada e com alguns receios. Obrigada!

A CAPES, pela bolsa que me permitiu dedicação exclusiva na elaboração desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Comportamento e Biologia Animal por me fornecer todo o suporte físico e todo o amparo necessários para a elaboração desse projeto.

À secretaria da Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Comportamento e Biologia Animal, pela ajuda com toda a parte burocrática e disposição em ajudar sempre.

À professora Bernadete, muito obrigada pela atenção, orientação e conversas sempre muito agradáveis. Por esse bom humor inabalável, que me acalmava sempre que eu chegava desesperada com alguma coisa. Obrigada por tornar possível a realização desse sonho!

À professora Maria Christina, uma apaixonada pelo conhecimento, que topa qualquer desafio para nos ajudar! Obrigada pela dedicação em me ensinar histologia, em identificar os tecidos; você conseguiu uma proeza: fez com que eu gostasse de histologia, algo que eu achei que nunca aconteceria. Obrigada por tudo!

À professora Nadja, da Universidade Gama Filho, pela atenção e ajuda.

Gabi, minha doce amiga, irmã de coração, obrigada por me incentivar sempre, por se preocupar, pelas ajudas, conselhos, broncas... Por me incentivar e ser tão presente em minha vida.

Tio Aloysio, Tia Marisa, Ana Paula e Regina Célia que sempre me receberam em sua casa, todas as vezes que foi necessário ir à Cidade Maravilhosa. Por me fazerem me sentir em casa, mesmo quando eu estava bem distante dela. Acolhida maravilhosa e extremamente valiosa! Muito obrigada por tudo!

Tia Joana, Bruno, Karola e Lulu, obrigada pela companhia e acolhida em Barra do Pirai. Pela paciência em me esperar algumas horas na UFRRJ e sobretudo, por tornarem tudo mais fácil e agradável pra mim!

À Maria, Liliane, Bianca, Guilherme, Jean, Ivaneide, Jamily e todos os colegas do Projeto TAMAR- Base de Anchieta/ES, pela ajuda, recepção calorosa e conversas relaxantes. Por cederem parte do seu espaço para que eu pudesse executar a coleta do material. Muito obrigada!

Carolina Jorge, minha querida amiga e veterinária n°1 das tartarugas, obrigada por me deixar acompanhar seu dia-a-dia, por me ajudar nas primeiras dissecações com uma paciência que parecia não ter fim. Pelos momentos de descontração, churrascos, cafés, shows... Companhia sempre bem vinda e muito animada!

Ao Rodrigo Barcellos, pela ajuda e dicas muito úteis no começo das coletas. Pela companhia agradável e amizade!

Adélio Lubiana, muito obrigada pelos artigos, conselhos e trocas de experiências. Isso fez toda a diferença na realização desse projeto!

À Iara Novelli, pelas sugestões, conselhos e pela disponibilização de material muito úteis nesse trabalho.

Lúcio Lima, muito obrigada pela ajuda (e paciência) com a formatação das figuras!!

Manoel, obrigada pela paciência para me ensinar a calibrar o ImageJ! Ter amigos antenados em tecnologia num é pra qualquer um!

Leandro Hohl, o que seria de mim sem você, pra me ensinar a mexer em todos esses TPSs? Muito obrigada pela boa vontade e disposição em me passar seus conhecimentos sobre todos os programas e pelo seu guia passo-a-passo salvador. Por me socorrer sempre que precisei! Você foi uma parte crucial nesse projeto. Obrigada, obrigada!

Ao professor Oscar Rocha-Barbosa, por abrir meus olhos para a morfometria geométrica, me recebendo de braços abertos na UERJ e em seu laboratório.

Ao Marcelo, pela dedicação e excelente trabalho na elaboração de parte das lâminas utilizadas nesse trabalho. Muito obrigada.

À Dra Sandra e ao Willian, do CIDAP, por toda a ajuda e disponibilidade.

Luana e Victor Hugo, pelas conversas sempre muito divertidas e agradáveis e pela disponibilidade de ajudar sempre.

Nana, Rogério e Carlinha, estagiários do Projeto TAMAR, obrigada pela ajuda na coletas dos exemplares e por tornarem meu trabalho mais divertido.

Aos meus queridos colegas de mestrado, afinal estamos todos juntos na mesma jornada, em busca do conhecimento e crescimento profissional e pessoal.

À Rosiane, Elzi, Lu, Dayse, Aline, Zé Márcio, Leo e Tatão, pelo apoio e compreensão ao longo desses dois anos.

Audrinho, figura divertida que acreditou no meu sonho e me incentivou sempre a nunca desistir e a persistir! Obrigada!

As gêmeas do meu coração Sarah e Suzana, a Natália e ao Robson, pelos momentos vivenciados no ES, por compartilharem um pouquinho do projeto de vocês comigo e por permitirem que eu fizesse o mesmo com vocês. Pelas conversas à beira da praia ou degustando um bom cafezinho.

Maria Lina, pela boa vontade e disponibilidade em me ajudar sem nem mesmo me conhecer!

Bianca, muito obrigada pela disposição e boa vontade em me ensinar a trabalhar no DIC.

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 Anchieta/ES 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*. O objetivo do presente trabalho foi realizar a identificação sexual de filhotes de *C. caretta* através da morfometria geométrica e da histomorfologia. Foram utilizados 73 filhotes natimortos, coletados em diversos ninhos ao longo da Praia da Guanabara, Anchieta, Espírito Santo, Brasil. Para a análise morfométrica, cada animal teve a carapaça fotografada. Posicionado em decúbito dorsal foram retirados o plastrão, intestino grosso, fígado e bexiga para permitir a visualização das gônadas e rins, que após fotografados foram armazenados em formalina 10% tamponada. Foram utilizados os softwares TPSUtil, TPSDig2, CoordGen, PCAGen e CVAGen para as análises morfométricas. O processamento do material seguiu as etapas convencionais da técnica histológica. Com base na análise de componentes principais (PCA), PC1 explicou 19,83% da variação na carapaça dos filhotes, enquanto PC2 explicou 14,71%. Análise de variáveis canônicas revelou que há uma tendência de dimorfismo sexual entre os filhotes, através da carapaça e que essa pode estar relacionada com o sexo dos exemplares. As gônadas estavam localizadas próximas ao hilo renal, com formato filiforme. Nos ovários foi possível observar um córtex com epitélio cúbico e bem desenvolvido, associado a uma medula desorganizada e rica em matriz intersticial. O córtex dos testículos era composto por uma fina camada de epitélio pavimentoso simples, uma medula muito bem desenvolvida e com pouca matriz intersticial, observando-se vários túbulos seminíferos, nitidamente distinguíveis. Trabalhos realizados com filhotes de tartaruga cabeçuda e outras espécies de quelônios, utilizando a morfometria geométrica, também demonstraram haver diferenças na carapaça 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 útil, tendo a histomorfometria das gônadas de filhotes de *C. caretta*, confirmado o dimorfismo sexual apontado pela morfometria geométrica.

Palavras-Chave: filhotes, tartaruga marinha, histologia, morfometria geométrica

ABSTRACT

The hatchlings and juvenile turtles have not anatomically visible secondary sex characteristics, it is not possible to differentiate sex by viewing the carapace. Several authors advocate histological analysis as the best technique for performing sexing chicks of the species *Caretta caretta*. The aim of this study was to identify sex of baby *C. caretta* by geometric morphometrics and histomorphology. 73 stillborn pups were used, collected in different nests along the Guanabara's, Beach Anchieta, Espírito Santo, Brazil. For morphometric analysis each animal had photographed the shell. Were positioned supine removed the plastron, large intestine, liver and bladder to allow visualization of the kidneys and gonads, photographed after they were stored in 10% buffered formalin. We used the software TPSUtil, TPSDig2, CoordGen, PCAGen CVAGen for morphometrics analysis. The histological analysis followed the steps of conventional histological technique. Based on principal component analysis (PCA), PC1 explained 19.83% of the variation in the carapace of the puppies, while PC2 explained 14.71%. Canonical analysis revealed that there is a trend of sexual dimorphism between the pups through the carapace and that this may be related to the sex of the specimens. The gonads were located near the renal hilum, with threadlike format. Ovarian cortex was possible to observe a cuboidal epithelium with well developed, 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 marrow and low interstitial matrix, observing several seminiferous tubules clearly distinguishable. The macroscopic analysis of gonads alone does not allow the differentiation of the sexes, thus corroborating other work done with this species and other sea turtles. Work done with baby loggerhead turtles and other species also showed significant differences in the carapace that distinguish the sex of newly hatched chicks. The histological features were similar to those identified by other authors, some argue that the macroscopic analysis is sufficient to identify the sex of pups, 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 cubs *C. mydas*, but authors disagree on this method to other species. The geometric morphometrics has the potential to Histology is an excellent tool for choosing to sex most used so far.

Keys-Word: hatchlings, sea turtle, histology, geometric morphometrics

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotografias das tartarugas marinhas que ocorrem no Brasil: A- tartaruga cabeçuda; B- tartaruga oliva; C- tartaruga gigante; D- tartaruga de pente; E- tartaruga oliva..... 4
- Figura 2.** Fotografias das tartarugas que não ocorrem no Brasil: A- *Natator depressus*; B- *Lepidochelys kempii*..... 5
- Figura 3.** Desenho ilustrativo de um exemplar de *Caretta caretta*..... 6
- Figura 4.** Fotografia de filhote recém eclodido de tartaruga cabeçuda se dirigindo para o mar..... 7
- Figura 5.** Esquema do sistema urogenital de tartarugas..... 9
- Figura 6.** Fotografia mostrando a abertura dos ninhos e coleta dos natimortos de *Caretta caretta*..... 14
- Figura 7.** Fotografia da dissecação dos espécimes de *Caretta caretta* e coleta das gônadas. Foto: Jeancarlos Alves..... 15
- Figura 8.** Fotografia evidenciando as “landmarks” registradas na carapaça de filhote de *Caretta caretta*..... 15
- Figura 9.** Grades de deformação que representam a forma média de (A) machos de *Podocnemis expansa* e (B) fêmeas de *P. expansa* (C) machos de *Chrysemys picta* e (D) fêmeas de *C. picta*, como encontrados ao longo do eixo da função discriminante entre os sexos. Círculos cinzas sólidos destacam as regiões da carapaça com diferenças significativas entre os sexos, enquanto as regiões ovais tracejadas pretas denotam as diferenças significativas mais pronunciadas entre as espécies..... 16
- Figura 10.** Após a sobreposição das coordenadas procrustes, gerou-se essa distribuição dos sexos, onde os machos são representados pelos pontos pretos e as fêmeas pelos quadrados rosas. Observe 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..... 18
- Figura 11.** Grade de deformação baseada nos valores de PC1. É possível observar na área circulada de preto o achatamento da região da carapaça dos filhotes de *C. caretta*, onde se localizam o primeiro e o segundo pares de placas laterais..... 19

Figura 12. Grade de deformação gerada a partir de PC2, na qual é visível, nas áreas circulares de preto, o achatamento da região posterior da carapaça, através da compressão da terceira, quarta e quinta placas vertebrais, do quarto e quinto pares de placas laterais e das placas supra caudais..... 19

Figura 13. Distribuição dos sexos gerada após a análise de função discriminante, que foi amplificada em 10 vezes, para enfatizar a diferença entre os grupos. As bolas pretas representam os machos e as cruzeiras pretas representam as fêmeas..... 20

Figura 14. Vista ventral da cavidade peritoneal de *Caretta caretta*, destacando-se: a: traquéia; b: coração; c: estômago; d: intestino; e: rim; f: gônada; g: fígado..... 22

Figura 15. Fotomicrografia de corte longitudinal dos tecidos, evidenciando do testículo de *Caretta caretta* (T) justaposta ao tecido conjuntivo da capsula renal (setas lilás); cortex renal (CR). (H&E 200X)..... 23

Figura 16. Fotomicrografia, em corte longitudinal, do aparelho reprodutor de fêmea de *Caretta caretta*, evidenciando: A: córtex com epitélio cúbico (b) e medula desorganizada (a) (H&E 200X); B: destaque para o córtex com tecido cúbico estratificado (a), medula rica em matriz intersticial (b) (H&E 400X), C: Fotomicrografia de Malvásio *et al* (2012), evidenciando as mesmas estruturas nos ovários de *Podocnemis expansa* (H&E 400X)..... 24

Figura 17. Fotomicrografia do aparelho reprodutor de macho, em corte longitudinal, de *Caretta caretta*, destacando-se o córtex com epitélio pavimentoso simples (a), medula bem desenvolvida (b) e túbulos seminíferos (c), (A – H&E 200X); (B – H&E 400X); C: Fotomicrografia de Malvásio *et al* (2012), evidenciando o oviduto remanescente (a), células de Sertoli (b), epitélio pavimentoso simples (c) e túbulos seminíferos (d) nos testículos de *Podocnemis expansa* (H&E 100X)..... 25

Figura 18. Fotomicrografias, em corte longitudinal, com coloração especial, destacando em A o ovário (O), revestimento estratificado dos ovários (setas azuis) de *C. caretta*. (Reticulina 200X) e em B destacando os túbulos seminíferos dos testículos (TS), evidenciando o seu envoltório reticular (setas azuis) (Reticulina 200X)..... 25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. As tartarugas marinhas.....	3
2.2. A espécie <i>Caretta caretta</i>	6
2.3. Histologia do trato uro-genital.....	8
2.4. Morfometria geométrica.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Obtenção dos espécimes.....	13
3.2. Coleta dos dados e análises morfométricas.....	13
3.3. Análises histológicas.....	16
4. RESULTADOS.....	18
4.1. Análise morfométrica.....	18
4.2. Análises histológicas.....	20
5. DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÕES.....	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32