

ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE
MESTRADO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE

AMANDA BUNGI ZALUSKI

**INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DA DETERMINAÇÃO E DA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL
DEPENDENTE DE TEMPERATURA EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) E EM DUAS ESPÉCIES DE
TARTARUGAS MARINHAS (*Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*)**

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA
BIODIVERSIDADE

AMANDA BUNGI ZALUSKI

**INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DA DETERMINAÇÃO E DA
DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DEPENDENTE DE TEMPERATURA EM
ZEBRAFISH (*Danio rerio*) E EM DUAS ESPÉCIES DE TARTARUGAS
MARINHAS (*Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*)**

Orientador(a): Dr^a Monica Ryff Moreira Roca Vianna

PORTO ALEGRE – RS

Maio, 2019

AMANDA BUNGI ZALUSKI

**INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DA DETERMINAÇÃO E DA
DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DEPENDENTE DE TEMPERATURA EM
ZEBRAFISH (*Danio rerio*) E EM DUAS ESPÉCIES DE TARTARUGAS
MARINHAS (*Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*)**

Dissertação de Mestrado
apresentada à Escola de Ciências
da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul
como requisito para a obtenção
do título de Mestre em Ecologia
e Evolução da Biodiversidade.

Orientador(a): Dr^a Monica Ryff Moreira Roca Vianna

PORTO ALEGRE - RS

2019

Ficha Catalográfica

Z22i Zaluski, Amanda Bungi

Investigação de mecanismos da determinação sexual e da diferenciação sexual dependente da temperatura em zebrafish (*Danio rerio*) e em duas espécies de tartarugas marinhas (*Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*) / Amanda Bungi Zaluski . – 2019.

98.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Monica Ryff Moreira Roca Vianna.

1. desenvolvimento sexual. 2. gônadas. 3. hormônios. 4. ELISA. 5. qRT-PCR. I. Vianna, Monica Ryff Moreira Roca. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

AMANDA BUNGI ZALUSKI

**INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DA DETERMINAÇÃO E DA
DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DEPENDENTE DE TEMPERATURA EM
ZEBRAFISH (*Danio rerio*) E EM DUAS ESPÉCIES DE TARTARUGAS
MARINHAS (*Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*)**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em 29 de março de 2019.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega - UNESP

Profa. Dra. Maíra Carneiro Proietti - FURG

Prof. Dr. Gunther Gehlen - FEVALLE

PORTO ALEGRE – RS

2019

RESUMO

Os mecanismos de determinação sexual variam grandemente entre grupos de animais vertebrados. As tartarugas marinhas possuem a determinação sexual dependente da temperatura, sendo que, ao longo do tempo de incubação dos ovos, há o período termossensitivo no qual ocorre a diferenciação das gônadas. Assim como as tartarugas, alguns peixes também apresentam este tipo de determinação, sendo o *zebrafish* (*Danio rerio*) um modelo animal usado em diversas pesquisas em diferentes áreas que, apesar do amplo uso, ainda não possui as condições e mecanismos de diferenciação sexual totalmente elucidados. Além da temperatura, fatores genéticos e ambientais também podem atuar na diferenciação sexual nestas espécies. Esta dissertação teve duas etapas. Na primeira etapa foram padronizadas as técnicas de investigação do mecanismo de determinação sexual dependente da temperatura em *zebrafish*. Os resultados demonstram que o *zebrafish* passa primeiramente por uma fase de hermafroditismo juvenil antes da diferenciação sexual. A exposição a temperaturas controladas (24°C, 26°C, 28°C e 30°C) durante o período de desenvolvimento inicial induziu alterações nas taxas de eclosão e sobrevivência ao longo de 7 dias pós-fertilização, avaliados a partir de 4 horas pós-fertilização, bem como batimentos cardíacos de embriões com 24 e 48 horas pós-fertilização. Análises histológicas das gônadas demonstraram que as diferentes temperaturas avaliadas podem atrasar ou acelerar o processo de desenvolvimento sexual durante a fase inicial em relação aos animais mantidos à 28°C. Análises da proporção sexual demonstraram que temperaturas intermediárias (26 e 28°C) podem favorecer o desenvolvimento de uma maior proporção de machos. A segunda etapa teve como objetivo investigar aspectos do desenvolvimento sexual de duas espécies de tartarugas marinhas (*Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*) a fim de contribuir para o entendimento dos mecanismos de determinação e diferenciação sexual e o estabelecimento de métodos que permitam a sexagem dos mesmos em distintas fases do desenvolvimento de forma mais prática e menos invasiva do que as utilizadas atualmente. Tartarugas marinhas filhotes ao nascerem já apresentam o sexo definido, tendo o grau de desenvolvimento diferente entre as espécies *Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*, provavelmente devido ao menor tempo de incubação de *C.caretta*. Com a padronização das técnicas de ELISA foi demonstrado que kits para avaliação de hormônios sexuais humanos podem ser utilizados para quantificação de hormônios tanto para *zebrafish* quanto tartarugas marinhas. As análises da expressão de genes envolvidos no processo de diferenciação sexual estão em andamento.

Palavras-Chave: desenvolvimento sexual, gônadas, hormônios sexuais, ELISA, qRT-PCR; *Caretta caretta*; *Eretmochelys imbricata*; *Danio rerio*.

ABSTRACT

Mechanisms of sexual determination vary greatly among vertebrates. Sea turtles show temperature dependent sex determination with a thermosensitive period during egg incubation in which the gonad differentiation occurs. Like turtles, some fish also are temperature sensitive. Zebrafish (*Danio rerio*) is an animal model used in several areas of biomedical research that, despite its widespread use, whose sexual differentiation conditions and mechanisms are not fully elucidated. In addition to temperature, genetic and environmental factors may also play a role in the sexual differentiation of these species. This dissertation had two parts. In the first, the techniques for investigating the sex-dependent mechanism of sexual determination in zebrafish were standardized. Our results demonstrate that zebrafish first undergoes a stage of juvenile hermaphroditism prior to sexual differentiation. Exposure to controlled temperatures (24 ° C, 26 ° C, 28 ° C or 30 ° C) during the initial developmental period starting at 4 hours post fertilization (hpf) significantly influenced hatching and survival rates over the first 7 days post-fertilization (dpf). Embryonic heart rate at 24 and 48 hours post-fertilization were also impacted. Histological analyzes of the gonads demonstrated that different temperatures evaluated may delay or accelerate the process of sexual development during the initial phase compared to animals kept at 28°C. Analysis of the sex ratio has shown that intermediate temperatures (26 and 28 ° C) may favor the development of more males. The second part of this study aimed to investigate aspects of the sexual development of two species of sea turtles (*Caretta caretta* and *Eretmochelys imbricata*) in order to contribute to the understanding of the mechanisms of sexual determination and differentiation and the establishment of methods that allow the sexing of the same in phases of development in a more practical and less invasive way than those currently used. Sea turtles born to cubs already have the defined sex, having a different degree of development between the species *Caretta caretta* and *Eretmochelys imbricata*, probably due to the shorter incubation time of *C.caretta*. With the standardization of ELISA techniques, it has been shown that kits for the evaluation of human sex hormones can be used to quantify hormones for both zebrafish and sea turtles. Analysis of the expression of genes involved in the process of sexual differentiation is under way.

Keywords: sexual development, gonads, hormones, ELISA, qRT-PCR; *Caretta caretta*; *Eretmochelys imbricata*; *Danio rerio*.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO GERAL	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Mecanismos de Determinação e Diferenciação sexual	12
1.1.1 Determinação Sexual Genotípica (GSD)	13
1.1.2 Determinação Sexual Dependente da Temperatura (TSD)	13
1.2 Determinação Sexual em Peixes	14
1.3 Determinação Sexual em Répteis	14
1.4 Genes envolvidos na Diferenciação Sexual	15
1.4.1 Diferenciação Sexual em <i>Zebrafish</i>	15
1.4.2 Diferenciação Sexual em Tartarugas Marinhas	16
2 JUSTIFICATIVA	18
3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	20
CAPÍTULO 1 – Artigo Científico	25
INTRODUÇÃO	27
1. MATERIAL E MÉTODOS	29
1.1 Animais e Ética	29
1.2 Delineamento Experimental.....	29
1.3 Amostragem	30
1.4 Parâmetros Embrionários	30
1.5 Análise Histológica	31
1.5.1 Dissecção de gônadas em adultos	31
1.5.2 Análise Histológica das gônadas	32
1.6 Real Time RT-PCR (qRT-PCR)	32
1.7 ELISA	33
1.8 Proporção Sexual	33

1.9 Análise Estatística	34
2. RESULTADOS	34
2.1 Parâmetros Embrionários	34
2.1.1 Taxas de Eclosão e Sobrevivência	34
2.1.2 Batimentos Cardíacos	35
2.1.3 Morfologia	35
2.2 Histologia das gônadas de larvas, juvenis e adultos	37
2.2.1 Fase de hermafroditismo	37
2.2.2 Diferenciação sexual	39
2.2.3 Definição do sexo	39
2.2.4 Dimorfismo sexual	39
2.3 Real Time qRT-PCR	40
2.4 ELISA	40
2.5 Proporção sexual	40
3. DISCUSSÃO	41
REFERÊNCIAS	54
CAPÍTULO 2 – Artigo Científico.....	57
INTRODUÇÃO	59
1. MATERIAL E MÉTODOS	60
1.1 Área de Estudo e Licenças	60
1.2 Coleta e Processamento das Amostras	61
1.3 Análise das Gônadas.....	61
1.3.1 Morfologia Externa das gônadas	61
1.3.2 Análise Histológica	62
1.4 Análise Estatística	62
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
REFERÊNCIAS	74

CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS – Artigo em andamento.....	82
REFERÊNCIAS	91
Anexo A – Carta de Aprovação CEUA	94
Anexo B – Carta de Aprovação CEUA	95
Anexo C – Licença SISBIO	96
Anexo D – Licença SISBIO	97

APRESENTAÇÃO GERAL

A presente dissertação de mestrado, intitulada “Investigação de mecanismos da determinação e da diferenciação sexual dependente de temperatura em *zebrafish* (*Danio rerio*) e em duas espécies de tartarugas marinhas (*Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*)” é apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Este trabalho foi desenvolvido em duas etapas. A primeira teve como objetivo padronizar as técnicas propostas para estudar o processo de determinação sexual dependente da temperatura usando o *zebrafish* (*Danio rerio*) como animal modelo. Para isso foi realizado o acompanhamento do desenvolvimento embrionário, larval e juvenil de animais mantidos em aquários com temperaturas específicas, analisando o sexo dos mesmos por meio de técnicas histológicas, além de determinar as concentrações de hormônios envolvidos na diferenciação e determinação sexual através de ELISA. A segunda etapa teve como objetivo investigar aspectos do desenvolvimento sexual de duas espécies de tartarugas marinhas (*Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*) a fim de contribuir para o entendimento dos mecanismos de determinação e diferenciação sexual e o estabelecimento de métodos que permitam a sexagem dos mesmos em distintas fases do desenvolvimento de forma mais prática e menos invasiva. Entre os objetivos estavam determinar o sexo de natimortos e correlacionar o grau de desenvolvimento das gônadas com o tamanho do indivíduo, por meio de análises histológicas e morfométricas. Além disso, determinar o sexo de indivíduos vivos das mesmas duas espécies de tartarugas marinhas a partir dos níveis de hormônios sexuais (andrógenos e estrógenos) presentes no sangue e parâmetros celulares e moleculares através de ELISA, a fim de desenvolver novas técnicas para se determinar o sexo de tartarugas marinhas em diferentes fases da vida. A contribuição de genes alvo que possam estar envolvidos com vias hormonais androgênicas e estrogênicas também foram averiguados utilizando técnicas como qRT-PCR tanto em *zebrafish* quanto em tartarugas marinhas.

A seguir é apresentada uma breve introdução geral do tema, bem como o delineamento experimental do trabalho. Após os resultados já obtidos estão organizados em dois capítulos em formato de artigos a serem submetidos para publicação em periódicos indexados. Algumas etapas metodológicas ainda estão em andamento devido

a complexidade da obtenção de amostras e são apresentadas em um capítulo separado sob forma de anexo.

1. INTRODUÇÃO

A determinação e a diferenciação sexual estão entre os processos mais importantes da biologia reprodutiva. O sexo de um indivíduo é normalmente determinado durante a embriogênese, podendo ser por fatores genéticos, quando o sexo é determinado por cromossomos sexuais ou genes autossômicos, ou ainda, por fatores ambientais, podendo ser influenciado pela temperatura ou pela densidade populacional. Este processo geral é denominado de determinação sexual [1,2,3,4].

Nos mamíferos, por exemplo, no início do desenvolvimento há um primórdio de gônada bipotente a qual é capaz de se diferenciar em testículo ou ovário, que ocorrerá dependendo da presença ou ausência do cromossomo Y, respectivamente [4,5]. Este processo de formação de gônadas é denominado diferenciação sexual, e uma vez determinado o sexo do indivíduo, as gônadas recém diferenciadas secretam hormônios que direcionam a diferenciação do sistema reprodutivo, bem como as características secundárias de dimorfismo sexual em machos e fêmeas [2,6,7].

1.1 Mecanismos de Determinação e Diferenciação Sexual

Existem diferentes tipos de mecanismos envolvidos na determinação e na diferenciação sexual entre os vertebrados. Os genes de determinação do sexo iniciam uma série de processos durante o desenvolvimento que estabelecem o fenótipo feminino e masculino [2]. Dentre estes mecanismos estão a determinação sexual genotípica e a determinação sexual dependente da temperatura.

As aves e mamíferos apresentam somente a determinação sexual genotípica (GSD), enquanto os crocodilos apresentam somente a determinação sexual dependente da temperatura (TSD) como mecanismo principal. Já nos lagartos, tartarugas, serpentes e peixes, os mecanismos podem variar dentro de cada grupo, sendo que em alguns pode ocorrer tanto a GSD quanto a TSD, bem como outros mecanismos menos estudados [8].

Enquanto os mecanismos de determinação sexual em mamíferos já são bem compreendidos, este não é o caso para a maior parte dos demais grupos de vertebrados. Acredita-se que os genes envolvidos no processo de determinação sexual nestes outros

grupos podem ser os mesmos que atuam na diferenciação sexual, sendo os principais deles expressos nas gônadas. Porém, alguns genes também podem ser expressos em outros órgãos e isso aumenta a complexidade do processo [9]. Como ainda não foram totalmente elucidados, precisam de mais estudos com outros grupos de vertebrados e maior detalhamento [9].

1.1.1 Determinação Sexual Genotípica (GSD)

A determinação sexual genotípica (GSD) ocorre na maioria dos vertebrados. Este mecanismo apresenta elementos genéticos específicos que resultam em indivíduos machos e fêmeas [10].

Na GSD existem dois sistemas, um no qual os machos podem ser heterogaméticos e apresentar cromossomos XY, como no caso dos mamíferos, e outro no qual as fêmeas podem ser heterogaméticas e apresentar cromossomos ZW, como no caso das aves. Nestes organismos nos quais os cromossomos sexuais são heteromórficos o sexo é definido durante a fertilização, através da herança dos diferentes cromossomos sexuais herdados dos parentais. Esses genes se tornam ativos nas gônadas durante as fases embrionária ou larval, dependendo do organismo e com isso uma cascata de eventos é desencadeada [8].

Além disso, a GSD pode ser dividida em duas formas. A determinação do sexo pode ocorrer através de cromossomos heteromórficos, como os mamíferos e as aves. Ou através, da determinação poligênica, na qual os genes determinantes do sexo estão distribuídos no genoma em cromossomos autossômicos, sem que haja a denominação de cromossomos sexuais, como é o caso de peixes que apresentam a determinação sexual genética [11].

1.1.2 Determinação Sexual Dependente da Temperatura (TSD)

Outro mecanismo comum ocorre pela influência de fatores externos, sendo o mais comum deles a temperatura do ambiente. A Determinação Sexual Dependente da Temperatura (em inglês *temperature sex determination* ou TSD) foi primeiramente descrita nos répteis (tartarugas e crocodilos). Ainda hoje, este mecanismo primário de determinação sexual não é bem compreendido, mas sabe-se que ocorre nas espécies que apresentam o cromossomo Y indiferenciado [8]. Além disso, a TSD foi descrita

inicialmente como um caso de plasticidade fenotípica na qual as condições ambientais durante a reprodução representam um impulsionador da dinâmica populacional [12].

A influência da temperatura durante o desenvolvimento dos embriões varia entre os diferentes grupos de vertebrados, sendo possível que, temperaturas mais elevadas gerem tanto uma maior quantidade de fêmeas quanto de machos. Nos crocodilos, quanto mais elevada a temperatura maior é a proporção de machos, enquanto na maioria das tartarugas, temperaturas elevadas produzem mais fêmeas [8].

Na TSD as gônadas em desenvolvimento apresentam cristas genitais bipotentes, divididas em córtex e medula. Durante o processo de diferenciação sexual nos vertebrados, o ovário se desenvolve a partir do córtex e os testículos da medula [8].

1.2 Determinação Sexual em Peixes

Os peixes apresentam uma ampla gama de mecanismos que envolvem a determinação e diferenciação sexual. A diferenciação pode variar de animais hermafroditas até animais que apresentam gonocorismo, enquanto a determinação pode ocorrer por fatores genéticos ou ambientais [2]. Diversos estudos vêm sendo realizados demonstrando os mecanismos de determinação e diferenciação sexual. Porém, a diferenciação sexual ainda não é bem elucidada e a determinação sexual é bastante complexa e variável dentro deste grande grupo [13,14,15].

A determinação sexual varia amplamente em peixes, em *medaka* (*Oryzias latipes*), por exemplo, o sexo é determinado pela presença de cromossomos sexuais, que se encaixam no sistema XY-XX. Já a tilápia (*Tilapia* sp.), apresenta o sexo determinado por condições ambientais, principalmente pela influência da temperatura [4].

Alguns estudos têm demonstrado que o *zebrafish* (*Danio rerio*) no período inicial de desenvolvimento apresenta gônadas indiferenciadas, com características semelhantes ao ovário. Após algumas semanas estas gônadas desenvolvem-se em ovários ou degeneram e formam os testículos. Este tipo de desenvolvimento é chamado de hermafroditismo juvenil [2,16,17].

1.3 Determinação Sexual em Répteis

Já os répteis desenvolveram diversos mecanismos de determinação sexual já descritos. Em muitas espécies o sexo é determinado através da recombinação de cromossomos sexuais heteromórficos [12]. Isto ocorre na maioria das serpentes e alguns

lagartos, sendo que já foram observados dois tipos de sistemas de determinação sexual nestes grupos: XX-XY e ZZ-ZW [18,19].

Muitas tartarugas, os *sphenodontida*, alguns lagartos, e todos os crocodilianos, apresentam a determinação sexual dependente da temperatura como mecanismo principal, no qual o sexo é determinado pelas condições ambientais em determinado período durante o desenvolvimento gonadal [12,20,21].

Nas tartarugas marinhas, ao longo do tempo de incubação dos ovos (terço médio de incubação), existe um período termossensitivo, no qual ocorre a diferenciação das gônadas [22]. Há ainda uma temperatura determinante (temperatura pivotal), que resulta em uma proporção sexual de 1:1, ou seja, 50% de fêmeas para 50% de machos [23,24]. Se a temperatura durante o terço médio de incubação estiver mais elevada do que a temperatura pivotal do ninho (acima de 31°C, por exemplo), ocorre a prevalência de fêmeas. Se, a temperatura estiver mais baixa do que a temperatura pivotal (entre 28 e 30°C, por exemplo), ocorre um número maior de machos [25,26].

1.4 Genes e Hormônios envolvidos na Diferenciação Sexual

Os mecanismos de diferenciação sexual podem variar entre os grupos de vertebrados que apresentam a TSD. A diferenciação pode ser controlada tanto por genes específicos, como também por hormônios que são expressos, principalmente, nas gônadas dos indivíduos. A maioria dos genes envolvidos no desenvolvimento gonadal são bem conhecidos e conservados em vertebrados, porém o padrão da expressão gênica varia entre as espécies [8].

1.4.1 Diferenciação Sexual em *zebrafish*

O processo de diferenciação das gônadas em *zebrafish* é complexo e as informações ainda são escassas, mesmo com diversos estudos publicados sobre o tema [4,9,17,27,28,29,30]. Algumas evidências sugerem o envolvimento de fatores genéticos e hormonais neste mecanismo [27].

Nos últimos anos, trabalhos têm sido publicados com ambos os sexos de *zebrafish* a fim de identificar genes candidatos que possam estar envolvidos no processo de diferenciação sexual [4,9,14,15]. Entre eles, estão: hormônio antimulleriano (*amh*), o fator 1 de transição relacionado ao DM (*dmrt1*) [31], peptídeos de uma subfamília da família do Citocromo P450 A polipeptídeo 1 (*cyp19a1a* e *cyp19a1b*), que são expressos

nas gônadas e no cérebro, respectivamente [32,33,34], e o gene *sox9*, que está envolvido na masculinização dos indivíduos [27,29].

Sabe-se também que a diferenciação sexual em *zebrafish* pode ser influenciada por diversos fatores ambientais, dentre os principais estão a temperatura, que pode afetar diretamente a proporção sexual de indivíduos da população e pode retardar ou acelerar o desenvolvimento sexual [35]. A hipóxia, a exposição à poluentes, a densidade populacional dentro de cada aquário, bem como, a alimentação também, são fatores que influenciam a proporção sexual desta espécie, porém precisam de mais estudos para que os mecanismos através dos quais influenciam o desenvolvimento sejam identificados [35]. Todos estes fatores impactam tanto a determinação quanto a diferenciação sexual e resultam em uma interação entre o genoma e diversos fatores externos [27,35,36].

O desenvolvimento sexual é controlado por hormônios que desempenham um papel fundamental no processo de diferenciação sexual e na manutenção do sexo fenotípico. Nos peixes, por exemplo, o hormônio *17β- estradiol* possui um papel chave na diferenciação feminina, enquanto o desenvolvimento dos testículos é regulada pelo andrógeno testosterona [28,33]. A enzima aromatase (*cyp19*) também desempenha papel fundamental no desenvolvimento sexual, agindo na síntese do estrogênio, convertendo andrógeno em estrógeno, ou seja, testosterona em estradiol [27,35].

1.4.2 Diferenciação Sexual em Tartarugas Marinhas

Em tartarugas marinhas o desenvolvimento gonadal consiste em três fases principais, sendo a primeira a fase bipotente, na qual as gônadas iniciam o desenvolvimento e mantém a capacidade de originar ambos os sexos. Após, ocorre a determinação do sexo, durante o período termossensível e por fim as gônadas iniciam o processo de diferenciação sexual ao final deste período [30].

Assim como em outros vertebrados, muitos genes relacionados com a diferenciação sexual, como em mamíferos, possuem ortólogos já conhecidos em tartarugas marinhas. O gene *sox9*, por exemplo, está envolvido na diferenciação testicular, entre outras atividades [38], e ativa a transcrição do hormônio anti-mulleriano (*amh*). Este último, por sua vez, modula a expressão do gene *sfl* que tem papel na regressão das estruturas femininas formadas a partir dos ductos mullerianos [39], assim como nos peixes. Outro gene ativo é o *dmrt1*, também conhecido por estar envolvido no processo de

diferenciação e desenvolvimento dos testículos em vários grupos de vertebrados [37,40], bem como o gene *dax1 (nrb01)* envolvido na diferenciação dos ovários [33].

Nestes animais que apresentam TSD, a temperatura está correlacionada com a expressão da enzima aromatase (*cyp19*), pois ela está envolvida na produção do estrogênio e na determinação ovariana [37,41].

Nos últimos anos pesquisadores vem tentando entender como alguns hormônios atuam neste processo nos juvenis e adultos das sete espécies de tartarugas marinhas, em diferentes regiões e em diferentes intervalos reprodutivos. Segundo Hawkes *et al.*[42], sabe-se muito pouco sobre a ontogênese da expressão absoluta e sazonal dos hormônios sexuais destes animais, o que torna complexa a comparação entre os diferentes estágios de vida. Já foi demonstrado que temperaturas quentes podem resultar em altas concentrações do hormônio estradiol, pois a temperatura estimula a atividade da aromatase, que converte testosterona em estradiol [42,43]. Para Hawkes *et al.*[42] estes hormônios sexuais também podem ter outros papéis adicionais nas tartarugas juvenis, como crescimento e desenvolvimento ósseo, além de uma função imunológica, porém estes ainda não são bem compreendidos.

Para tartarugas marinhas, sabe-se também que logo antes da migração dos adultos para suas áreas reprodutivas, a concentração plasmática de estradiol começa a diminuir enquanto a concentração de testosterona aumenta de forma acentuada [44,45]. O estradiol também é responsável pela vitelogênese nas fêmeas, e possivelmente ocorre um aumento concomitante na produção de vitelogenina semanas antes da migração [45]. Assim, a testosterona e o estradiol aumentam à medida que a época de nidificação se aproxima, o que sugere que a produção de vitelogenina já está completa antes do início do período de nidificação [45,46,47]. O processo da vitelogênese é regulado por diversos hormônios envolvidos no desenvolvimento sexual durante todos os estágios de vida das tartarugas marinhas. Nesse caso, a progesterona pode inibir a produção de vitelogenina, bem como baixas concentrações de testosterona também podem inibir esta produção, ou seja, ambos hormônios podem cessar a vitelogênese ao final do ciclo ovariano [45,48,49], necessitando de mais estudos para entender o funcionamento destes hormônios.

2. JUSTIFICATIVA

Para melhor entender os mecanismos de determinação e diferenciação sexual em vertebrados que apresentam o sexo determinado pela temperatura do ambiente, é de grande importância avaliar estes mecanismos em grupos distintos. Assim utilizou-se de animais modelos para realizar padronizações de novas técnicas, a fim de conservar amostras de difícil obtenção de animais aos quais se tem acesso reduzido, principalmente em vertebrados ameaçados em algum nível de extinção.

Neste contexto, o presente trabalho utilizou inicialmente o *zebrafish*, que é um modelo animal bem estabelecido e com amostras de fácil obtenção. Apesar de ter os mecanismos de desenvolvimento sexual estudados, sabe-se que as condições de manutenção dos animais podem impactar a diferenciação sexual, incluindo fatores como temperatura, hipóxia, exposição a poluentes, densidade populacional e alimentação [8]. Além disso, as descrições existentes na literatura usam abordagens metodológicas pontuais para caracterizar os resultados, que variam significativamente

Assim, o conhecimento do impacto da temperatura no desenvolvimento sexual destes animais é de extrema importância para o melhor entendimento da biologia dos mesmos, além de potenciais implicações nas proporções sexuais de populações de *zebrafish* e condições de bioterismo [8]. Para animais selvagens, além destes aspectos o projeto também pretendeu testar novas metodologias para diferenciar machos e fêmeas que não apresentam caracteres sexuais externos para diferenciação, como é o caso das tartarugas marinhas.

Os impactos de muitos fatores ambientais sobre as tartarugas ainda são pouco compreendidos, primeiramente pela dificuldade em se coletar as amostras necessárias e também pelo fato de os animais não apresentarem caracteres sexuais externos até aproximadamente 40 anos de vida. A determinação sexual em tartarugas marinhas é regulada pela temperatura de incubação dos ovos e, por hormônios esteroides, os quais têm sido relatados por auxiliar diversas ações fisiológicas e comportamentais em tartarugas marinhas, principalmente durante as épocas de nidificação [37].

Entender como estes hormônios sexuais, bem como os produtos de genes de interesse podem estar envolvidos no desenvolvimento sexual são fundamentais para uma maior compreensão da biologia destes animais. Os dados obtidos a partir da análise destes hormônios podem ser utilizados para estabelecer os níveis hormonais basais e potencialmente auxiliar na identificação do sexo de indivíduos juvenis e confirmar o sexo de animais adultos, auxiliando no monitoramento da proporção sexual em diferentes áreas de alimentação e reprodução das espécies de tartarugas marinhas [37].

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

PARTE I

A primeira etapa do projeto foi desenvolvida no Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso da Escola de Ciências e no Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) da PUCRS, os quais apresentam a estrutura necessária para criação e manutenção do *zebrafish*, bem como os equipamentos necessários para a execução desta pesquisa. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da universidade (CEUA-PUCRS), sob número 8134/17, em anexo.

A manipulação dos animais foi realizada conforme os procedimentos descritos por Westerfield [50] em relação a utilização de peixes em laboratório. Seguindo também as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal [51] e de acordo com a lei n 11.794 (Lei Arouca 2008) [52].

Os embriões utilizados foram obtidos através de cruzamentos de peixes adultos, da espécie *Danio rerio*, linhagem selvagem AB, os quais possuíam mais de 7 meses de vida e foram produzidos e criados no laboratório. Os peixes adultos foram mantidos em grupos de até 15 indivíduos por aquário (7,5 litros), com um sistema de filtragem em série (Zebtec®, Tecniplast, Itália). Nesse sistema são controladas diariamente as concentrações de amônia (<0.5 ppm), nitritos (<1 ppm), nitratos (<80 ppm) e cloro, assim como a temperatura ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e o pH (7,0 a 7,5). Os animais foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 14/10 horas, respectivamente, recebendo ração flocada comercial (TetraMin, Tetra, Melle FRG) e artêmia (*Artemia salina*), três vezes ao dia [50].

O acasalamento também foi realizado conforme Westerfield [50], em um aquário de encaixe, no qual foram colocados uma fêmea e dois machos no mesmo ambiente, porém separados por uma divisória transparente, durante o período da noite. No início da manhã esta divisória é retirada e os animais ficam livres para acasalar. Os óvulos fecundados ficam retidos em uma grade presente no fundo do aquário de encaixe, e estes foram separados e utilizados ao longo do experimento.

Os embriões considerados viáveis foram higienizados e mantidos submersos em água do sistema (Osmose Reversa reconstituída com sais, Instant Ocean), preparada conforme Westerfield [50].

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, cada um com uma respectiva temperatura de manutenção em seu aquário (24°C, 26°C, 28°C e 30°C). A temperatura de 28°C foi usada como referência por ser aquela recomendada para a espécie e o grupo usado como referência (grupo controle). Aquecedores com maior precisão foram utilizados para controle da temperatura, sendo que a mesma foi definida uma única vez ao início do experimento. Os embriões foram coletados até 4 horas pós-fertilização (hpf) e colocados nos respectivos aquários nos quais se desenvolveram até a idade adulta com 4 meses pós-fertilização (mpf) em suas respectivas temperaturas (Figura 1). Ao término dos experimentos as larvas e juvenis foram crioeutanasiadas de acordo com as diretrizes do Institutional Animal Care and Use Committe [53], e os animais adultos foram eutanasiados por resfriamento rápido seguido de decapitação, como indicado pelo CONCEA [51] e analisados quanto à diversos parâmetros (Figura 2).

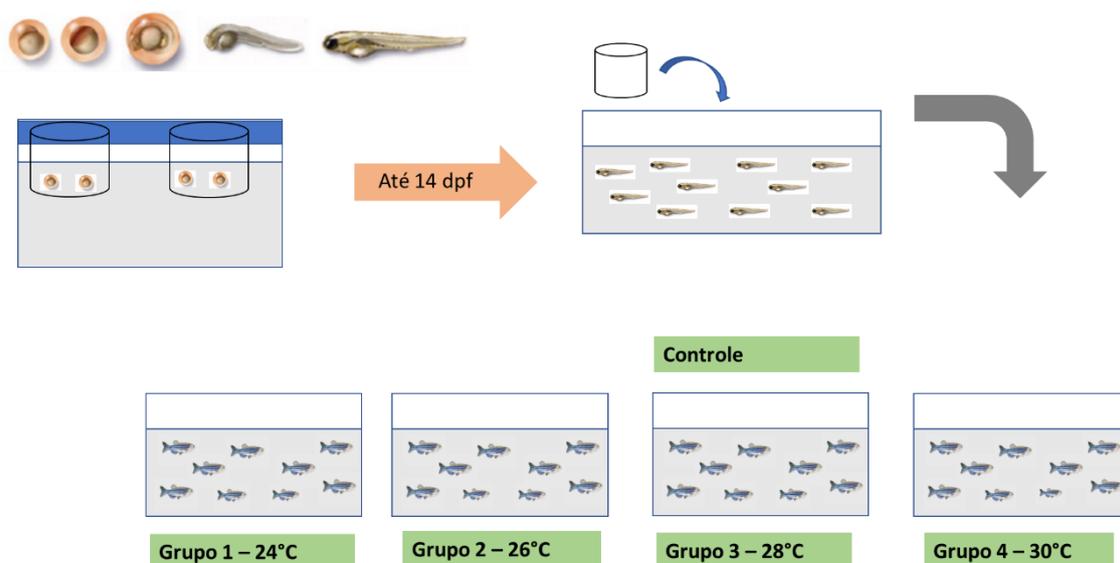


Figura 1. Delineamento experimental. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, cada um com uma respectiva temperatura no aquário sendo a temperatura de 28°C o grupo usado como controle. Os embriões coletados até 4 hpf, foram acondicionados em poços dentro de aquários de 19 L, após 14 dias pós-fertilização (dpf), as larvas foram retiradas dos poços e colocadas livremente para nadar no aquário com aproximadamente 3 L de água e à medida que os animais cresciam os níveis de água foram aumentados e desenvolveram-se até a idade adulta.

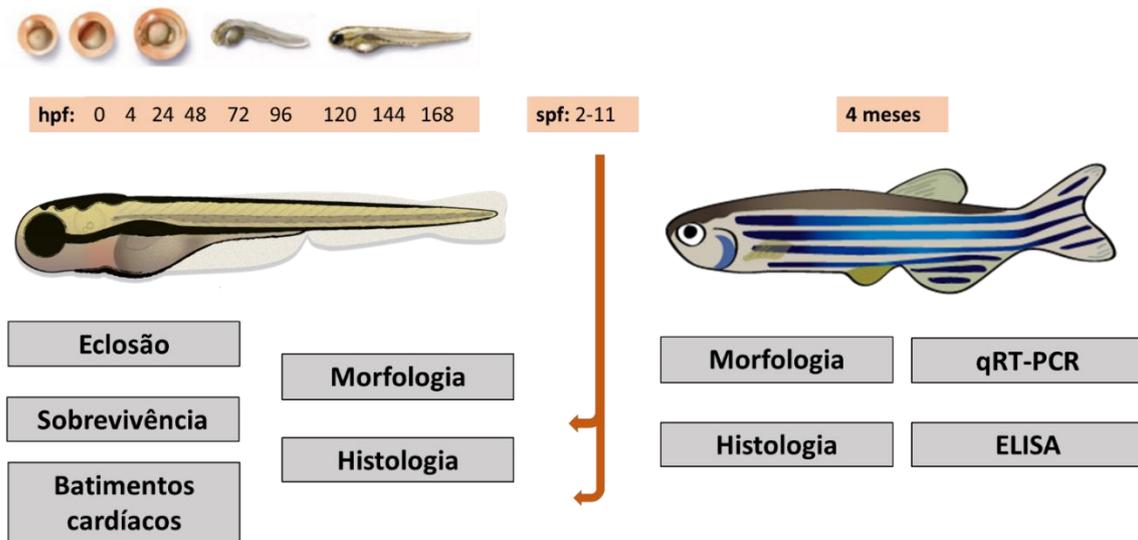


Figura 2. Delineamento experimental. Os embriões expostos a diferentes temperaturas até 4 horas pós-fertilização (hpf), foram analisados quanto a eclosão e sobrevivência ao longo de 7 dias pós-fertilização (dpf), quanto aos batimentos cardíacos com 48 hpf e 120 hpf, bem como morfologia e histologia das gônadas ao longo de 11 semanas pós-fertilização (spf). Os adultos com 4 meses pós-fertilização (mpf) também foram analisados quanto a morfologia e histologia das gônadas, além de genes específicos através de qRT-PCR e análises hormonais por ELISA.

PARTE II

A segunda etapa do projeto foi desenvolvida através de parcerias com ONGs responsáveis pelo monitoramento e reabilitação de tartarugas marinhas distribuídas ao longo da costa brasileira, na qual foram coletadas as amostras necessárias para o desenvolvimento da pesquisa. As respectivas análises foram realizadas no Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso da PUCRS, onde havia os equipamentos necessários para execução da pesquisa. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da universidade (CEUA-PUCRS) sob número 8524/19, em anexo, e as devidas licenças referente à coleta e ao transporte de material biológico, concedidas pelo SISBIO, conforme lei federal.

As parcerias foram realizadas com ONGs localizadas nas respectivas áreas de alimentação e reprodução das duas espécies de tartarugas marinhas de interesse, bem como ONGs que mantinham em cativeiro estas espécies (*Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*). Dentre elas estão: Caminho Marinho, localizada em Rio Grande (litoral sul do Rio Grande do Sul), respectiva área de alimentação de juvenis de *C.caretta*; Projeto TAMAR – Vitória (Espírito Santo), área de reprodução e desova de

adultos de *C.caretta*; Projeto TAMAR – Praia do Forte (Bahia), área de reprodução e desova de adultos de *C.caretta*; Parque Nacional Marinho de Abrolhos (Bahia), respectiva área de alimentação de juvenis de *E.imbricata* e área de reprodução e desova de *C.caretta*; ONG Ecoassociados, localizada em Porto de Galinhas – Pernambuco, respectiva área de reprodução e desova de *E.imbricata* e ocasionalmente de *C.caretta*.

Nas áreas de desova ocorre o monitoramento noturno das praias à procura de fêmeas que estão saindo do mar para colocar seus ovos. Enquanto nas áreas de alimentação ocorre a captura intencional dos indivíduos através do mergulho livre, para as respectivas coletas de dados. Nestas áreas também há ocorrência de animais encalhados e mortos, dependendo da época do ano.

Cada indivíduo encontrado foi medido e quando possível fotografado. As medidas padrão de comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), medido desde o ponto médio anterior (escudo nugal) até a porção mais distal dos escudos supracaudais e a largura curvilínea da carapaça (LCC), medida no ponto mais largo da carapaça foram realizadas com uma fita métrica com precisão de 0,5 cm [54,55]. Os animais também foram marcados com anilhas disponibilizadas pelo Projeto TAMAR/ICMBio, ou apenas registrado o número daqueles animais já marcados. Os animais encontrados mortos ou que vieram à óbito em algum centro de reabilitação, passaram por um processo de necropsia e suas gônadas foram retiradas. Quanto aos animais vivos foram coletados no mínimo 2 ml de sangue através da punção venosa no seio cervical, com uma seringa de insulina heparinizada [56,57] (Figura 3).

Nesta etapa a ideia principal foi entender a fase de desenvolvimento sexual e a proporção sexual dos filhotes recém-eclodidos em Pernambuco, a partir das gônadas de animais mortos. Além disso, através da coleta de sangue de animais em diferentes fases da vida, estabelecer valores hormonais de referência através da validação de métodos seguros, facilitando a identificação do sexo de juvenis e confirmação em adultos, tanto de animais selvagens quanto de cativeiro, em áreas de alimentação e reprodução de ambas espécies.

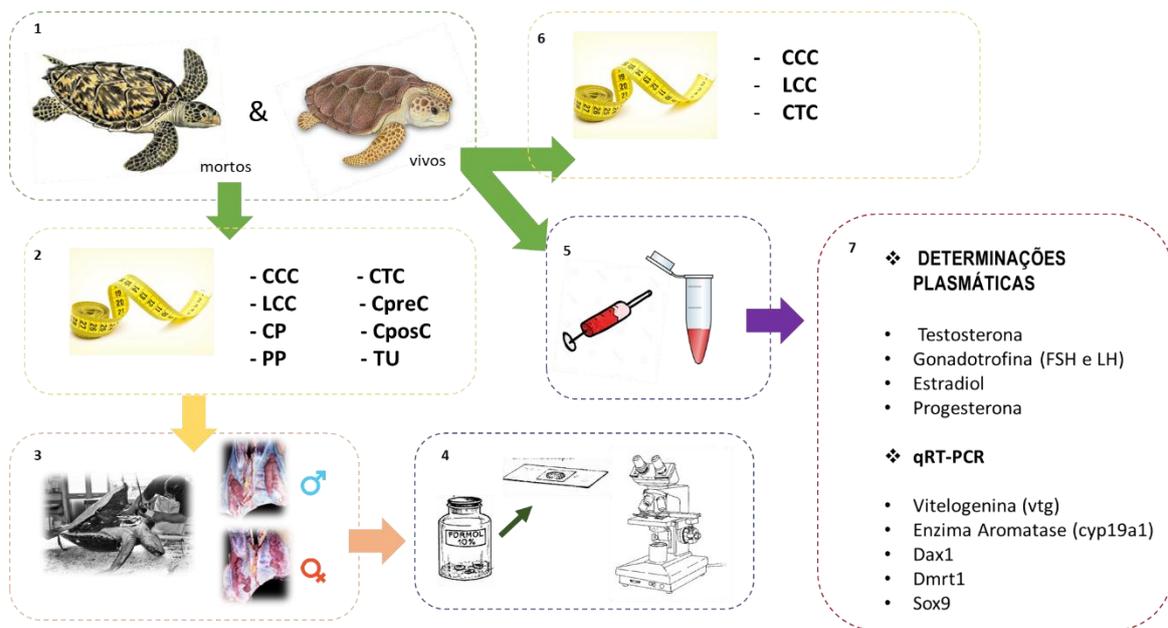


Figura 3. Delineamento experimental. **1.** As duas espécies de interesse são animais mortos e vivos de *Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*; **2.** Em campo, os animais mortos foram medidos e/ou fotografados; **3.** Em laboratório ocorreu a retirada da gônada direita, a qual foi medida e fotografada; **4.** Logo após foi fixada em formolaldeído 10%, e posteriormente passou por um processo de desidratação em álcool para serem confeccionadas as lâminas histológicas, as quais foram observadas em microscópio óptico; **5.** Em campo, foram retirados 2ml de sangue dos indivíduos vivos; **6.** Cada animal foi medido e/ou fotografado; **7.** Em laboratório foram quantificados os níveis hormonais por ELISA bem como a expressão de genes específicos através de qRT-PCR.

CAPÍTULO 1

Artigo Científico: “Avaliação da exposição à diferentes temperaturas sobre parâmetros morfológicos e moleculares do desenvolvimento sexual de larvas e adultos de *zebrafish* (*Danio rerio*)”

Highlights:

- À exposição a temperaturas controladas durante o período de desenvolvimento inicial induz alterações nas taxas de eclosão ao longo de 7 dias pós-fertilização e batimentos cardíacos de larvas com 24 e 48 horas pós-fertilização;
- As temperaturas podem atrasar ou acelerar o processo de desenvolvimento sexual durante a fase inicial;
- As temperaturas testadas influenciam no tamanho corporal de larvas com 14 dias pós-fertilização e nas taxas de proporção sexual;

Avaliação da exposição à diferentes temperaturas sobre parâmetros morfológicos e moleculares e do desenvolvimento sexual de larvas e adultos de *zebrafish* (*Danio rerio*)

Amanda Bungi Zaluski¹, Karina de Vargas Martinez¹, Raphaela Soares Fonseca¹, Paulo Cesar Patta¹, Fabio dal Moro Maito², Monica R.R.M. Vianna¹

1. Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil. e-mail: amanda.zaluski@acad.pucrs.br

2. Laboratório de Patologia Bucal, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

RESUMO

Os peixes apresentam a determinação sexual dependente da temperatura. No teleosteo *zebrafish* (*Danio rerio*) o mecanismo de determinação sexual ainda é incerto, podendo ser inverso em relação aos outros peixes, sendo em altas temperaturas maior proporção de fêmeas e em baixas temperaturas mais machos. Este estudo avaliou os efeitos da manutenção dos animais desta espécie a partir de 4 horas pós-fertilização (hpf) nas temperaturas de 24°C, 26°C, 28° e 30°C sobre parâmetros morfológicos e moleculares em larvas, juvenis e adultos. Os embriões foram avaliados quanto à morfologia (às 24 e 48 hpf), batimentos cardíacos às 48 e 120 hpf e taxas de eclosão e sobrevivência até 7 dias pós-fertilização (dpf). Ao longo de onze semanas (14 dpf até 77 dpf), cinco animais por grupo foram fotografados, eutanasiados em banho de gelo e acondicionados em formaldeído 10% tamponado, para posterior análise histológica das gônadas. Os embriões mantidos à 24°C apresentaram um desenvolvimento mais lento quando comparados com os embriões mantidos na temperatura referência (28°C) e 30°C. Os animais mantidos à 24°C também apresentaram retardo na eclosão e redução na sobrevivência (n= 50 em duplicata; p<0,0001) e batimentos cardíacos (n= 30 em triplicata; p<0,0001). Em relação ao sexo, os resultados confirmaram que o *zebrafish* passa por uma fase de hermafroditismo, até a 5 semana pós-fertilização (35 dpf), na qual todos os indivíduos apresentam gônadas com características femininas; após, ocorre a diferenciação sexual em macho ou fêmea e com 11 semanas pós-fertilização (77 dpf) já apresentam o sexo definido. Em animais mantidos à 30°C, a diferenciação sexual ocorre de forma precoce em muitos indivíduos, enquanto naqueles mantidos à 24°C essa diferenciação ocorre de forma tardia se comparado aos animais da temperatura referência (28°C). A proporção sexual demonstrou que temperaturas intermediárias (26

e 28°C) podem favorecer o desenvolvimento de mais machos. As análises moleculares e hormonais estão sendo realizadas para complementar os resultados apresentados e serão incluídos neste manuscrito antes da sua submissão.

Palavras-Chave: desenvolvimento sexual, temperatura, gônadas, hormônios, *Danio rerio*.

INTRODUÇÃO

Os peixes, assim como outros animais, apresentam a determinação sexual dependente da temperatura (TSD) em fases críticas do desenvolvimento inicial [1], e não possuem cromossomos sexuais, tornando difícil analisar o desenvolvimento inicial das células gonadais [2]. Alguns estudos têm demonstrado que o *zebrafish* é classificado como uma espécie gonocórica indiferenciada, na qual a diferenciação das gônadas envolve primeiramente um estágio de hermafroditismo juvenil [3,4,5,6]. Todos estes indivíduos desenvolvem células gonadais semelhante a ovários juvenis, que então degeneram e transformam-se em testículos nos machos ou continuam a se desenvolver em ovários nas fêmeas [1,3,4,5,6,7]. Diversos estudos demonstram que a temperatura é um dos fatores mais importantes para criação e manutenção do *zebrafish*. Permanece incerto o quanto a temperatura da água influencia no desenvolvimento sexual destes animais. Alguns autores sugerem que eles podem apresentar um padrão inverso em relação aos outros peixes, sendo em altas temperaturas maior proporção de fêmeas e em baixas temperaturas mais machos [8]. Além disso, há possibilidade de existir uma temperatura pivotal, a qual ocasiona a proporção de 1:1 entre os sexos. O *zebrafish* também pode apresentar um padrão no qual altas temperaturas (32 - 37°C) produzem mais machos e em baixas temperaturas (23°C) ocorre apenas um atraso no desenvolvimento das gônadas [7,9,10,11,12].

Além da temperatura, outros fatores e mecanismos também podem influenciar o desenvolvimento e a proporção sexual do *zebrafish*. Muitos hormônios já conhecidos estão envolvidos no desenvolvimento sexual e desempenham um papel fundamental no processo de diferenciação sexual. Nos últimos anos, muitos trabalhos têm sido realizados a fim de entender os efeitos destes hormônios e identificar genes candidatos envolvidos no processo de diferenciação sexual [2,7,13,14,15,16,17].

O hormônio *17 β -estradiol*, por exemplo, é conhecido por desempenhar papel chave na diferenciação feminina, enquanto o desenvolvimento testicular é regulado,

principalmente, pelo andrógeno testosterona [7,17]. A enzima aromatase (*cyp19a*) também atua convertendo andrógenos em estrógenos [7,13,18,19]. A expressão de diversos genes tem sido descrita com *zebrafish*, como *sox9* atuando no desenvolvimento dos testículos o qual resulta na determinação do sexo masculino, mesmo na ausência do gene *SRY* que está presente em mamíferos. Este gene é expresso nos testículos nas células de Sertoli, e nos oócitos em ovários femininos, sendo detectado em células somáticas no ovário juvenil [2,13,14]. O gene *dmrt1* também atua durante a diferenciação sexual, resultando na determinação do sexo masculino sendo expresso nos testículos no início da determinação do sexo e durante toda vida adulta nas células de Sertoli e nas espermatogônias, bem como no ovário em fêmeas, porém em níveis menores [2,13,14,16,20]. O hormônio antimulleriano (*amh*) atua durante a diferenciação sexual das gônadas, semelhante ao *sox9* e com regulação negativa, ou seja, ao contrário da expressão da aromatase [2,20].

Nas fêmeas, o papel de alguns genes também já foram descritos como o gene *foxl2*, o qual atua principalmente como um supressor no desenvolvimento dos testículos e leva ao desenvolvimento de ovários, porém ainda é pouco estudado e compreendido em *zebrafish* [2]. A aromatase (*cyp19a*), que é altamente expressa nos ovários, se comparado com outros tecidos atua em gônadas de fêmeas que estão no início da diferenciação enquanto o gene *nr0b1* (*dax1*) é expresso nos testículos e ovários, resultando na inversão sexual fenotípica macho-fêmea [21].

O processo de determinação e da diferenciação sexual e qual a influência da temperatura sobre estes eventos em *zebrafish* ainda são pouco estudados e publicados cientificamente. Entender a influência da temperatura e o desenvolvimento de enzimas estereoidogênicas sobre estes processos nestes animais pode ser de grande importância em estudos futuros no qual o sexo destes animais pode ser relevante para os diferentes parâmetros estudados [7,8,22]. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes temperaturas sobre diversos parâmetros embrionários, histológicos e moleculares em larvas, juvenis e adultos de *zebrafish*, bem como padronizar estas técnicas e entender como os genes e hormônios atuam nestes mecanismos.

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Animais e Ética

Adultos de *zebrafish* (*Danio rerio*), linhagem selvagem AB, com mais de sete meses de vida, mantidos em um tanque de recirculação (Zebtec®, Tecniplast, Itália) com sistema de controle de parâmetros de qualidade de água e um ciclo claro/escuro de 14/10 horas foram utilizados para o acasalamento em uma proporção de dois machos para uma fêmea. Os animais foram alimentados três vezes ao dia com ração flocada (TetraMin, Tetra, Melle FRG) e artêmia (*Artemia salina*), tendo as condições de temperatura, pH e condutividade da água constantemente monitorados. Na noite anterior ao acasalamento os casais foram separados em compartimentos com barreiras transparentes em aquários de reprodução (Tecniplast). As barreiras foram retiradas na manhã seguinte uma hora após o início do ciclo claro para o acasalamento dos animais. Os ovos fertilizados foram coletados, higienizados e transferidos para poços dentro dos aquários com as respectivas temperaturas experimentais conforme Westerfield, [23]. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética institucional (CEUA-PUCRS, número: 8134/17), seguindo as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) [24].

1.2 Delineamento Experimental

Os embriões coletados até 4 horas pós-fertilização (hpf), foram higienizados e acondicionados em poços dentro de aquários de 19 L com água com parâmetros de condutividade e pH adequados para a espécie e preparada após filtração por osmose reversa e adição de sais [23]. Os animais foram assim acondicionados para garantir o controle preciso de temperatura individual dos aquários com termostatos de precisão aliada à manutenção dos animais em volumes pequenos de água adequados para os estágios de desenvolvimento inicial. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, cada um mantido a partir de então em uma das temperaturas estudadas (24°C, 26°C, 28°C e 30°C). A temperatura de 28°C foi usada como referência por ser aquela recomendada para a espécie e o grupo usado como referência (grupo controle) [23]. A partir dos 5 dias pós-fertilização (dpf), as larvas foram alimentadas com ração moída (TetraMin, Tetra, Melle FRG) duas vezes ao dia. A temperatura foi regulada uma única vez ao início do experimento. Após 14 dpf as larvas foram para aquários com aproximadamente 3 L de água e alimentadas com artêmia (*Artemia salina*), além da

ração moída três vezes ao dia. À medida que os animais cresciam o volume de água dos aquários foram aumentados e após 35 dpf, os animais foram alimentados com artêmia (*Artemia salina*) e ração flocada (TetraMin, Tetra, Melle FRG) e três vezes ao dia até a idade adulta.

1.3 Amostragem

Ao longo de dez semanas, cinco animais por grupo foram retirados aleatoriamente dos aquários e colocados em placas de cultivo celular de 6 poços (um animal por poço), fotografados em estereomicroscópio invertido com câmera acoplada ao software NIS-Elements D 3.2 para Windows (Nikon Instruments Inc. Melville, EUA). Após a eutanásia as extremidades corporais foram removidas e fixadas para posterior análise histológica. Após padronização as amostras de larvas com até 21 dpf foram fixados em solução de Bowin's e as de animais com mais de 28 dpf fixadas em formaldeído 10% tamponado por 48-72 horas.

Os animais restantes no aquário desenvolveram-se até a idade adulta (120 dpf) quando foram fotografados, eutanasiados por resfriamento rápido seguido de decapitação e fixados em formolaldeído 10% tamponado para posterior análise histológica.

Amostras de animais com 56 dpf foram utilizadas para quantificação de expressão de genes específicos de diferenciação sexual através de qRT-PCR (n=12 por grupo em triplicata). As amostras de animais adultos com 90 e 120 dpf, foram utilizadas tanto para quantificação de hormônios por ELISA (n=10 por grupo em duplicata) quanto para avaliar a expressão de genes específicos envolvidos nos processos de determinação e diferenciação sexual por qRT-PCR (n=12 por grupo em triplicata).

1.4 Parâmetros Embrionários

Os animais foram mantidos em poços dentro de aquários com diferentes temperaturas e avaliados em relação a diversos parâmetros. A avaliação das taxas de eclosão e sobrevivência dos animais dos diferentes grupos foi realizada por acompanhamento diário em estereomicroscópio ao longo de 7 dpf para as taxas de eclosão e sobrevivência (n= 50 por grupo). Esta avaliação foi realizada de forma

paralela com e sem manipulação do experimentador a fim de identificar se a manipulação diária poderia influenciar os parâmetros avaliados, uma vez que tanto o rompimento do córion como eventuais lesões são possíveis decorrências da manipulação. Os grupos sem manipulação foram avaliados diretamente no recipiente moradia enquanto os com manipulação eram transferidos para outro recipiente para cada análise. Embriões mortos foram descartados imediatamente quando detectados. A morfologia dos embriões com 24 e 48 hpf e os batimentos cardíacos de embriões com 48 hpf e larvas com 120 hpf, também foram monitorados sob estereomicroscópio invertido (Nikon, Melville, USA) (n= 30 por grupo) por 60 segundos. Todas as análises foram realizadas em triplicata, em dias diferentes para minimizar possíveis fatores interferentes.

A morfologia de larvas com 14 dpf e juvenis com 21 e 28 dpf foram avaliadas principalmente quanto às características externas apresentadas. As características avaliadas foram o desenvolvimento e divisão da bexiga natatória e o tamanho corporal (n= 5 por grupo em triplicata).

1.5 Análise Histológica

Em larvas e juvenis, a histologia foi realizada para avaliar o momento em que tem início os processos de determinação e diferenciação gonadal e verificar a influência da temperatura nestes mecanismos. A análise histológica em adultos foi feita para confirmar o sexo dos animais e correlacionar com as características externas de dimorfismo sexual. Os troncos dos animais com 14 até 77 dpf (n= 5 por grupo) após fixados, passaram por um processo de desidratação através da imersão em álcool com uma série de concentrações graduais e, posteriormente por um processo de diafanização em xilol, seguido de impregnação em parafina (emblocamento). Os blocos foram cortados a 4 µm em um micrótomo (Lupetec, modelo MRP-09) e as lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE) e montadas com *Entellan*®.

1.5.1 Dissecção de gônadas em adultos

Animais adultos com 120 dpf, foram eutanasiados por resfriamento rápido, fotografados e suas gônadas foram retiradas (n= 10 por grupo). As gônadas foram retiradas da cavidade celomática, com uma tesoura pequena de incisão, através de uma incisão ventral a partir da abertura urogenital em direção à cabeça [25]. Após, foram fixadas em formaldeído 10%, seguindo a técnica descrita acima no item 1.5.

1.5.2 Análise histológica das gônadas

As gônadas foram fotografadas em microscópio óptico (Olympus CX41 e câmera Olympus U-SPT, Japan), e caracterizadas de acordo com Maack e Segner [6]; Okuthe *et al.*[26] e The Zebrafish Book [27]. As gônadas de juvenis foram analisadas e sexadas com base na configuração do tecido e na composição das células germinativas nos diferentes estágios de desenvolvimento, e nos adultos foram analisados os diferentes estágios do ovário nas fêmeas e nos machos a presença de túbulos seminíferos.

1.6 Real Time RT-PCR (qRT-PCR)

Para o qRT-PCR foram obtidas amostras de troncos de animais com 56 dpf (*pool* de 5 animais, n= 4 em triplicatas), e de gônadas de animais adultos (*pool* de 3 fêmeas e 5 machos, n= 2 em triplicatas), congeladas em nitrogênio líquido, acondicionadas com 300 µl de Trizol (Invitrogen) e armazenadas em *freezer* -80 °C. O RNAm foi isolado conforme Nery *et al.* [28] e o cDNA sintetizado com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits. A pureza do RNA foi quantificada usando nanodrop (ThermoScientific) e as amostras foram testadas por eletrofose em gel de agarose 1,0% com corante de ácido nucleico (Biotium).

Para todos os genes, o qRT-PCR foi realizado usando SYBR green qPCR supermix-UDG (Invitrogen). Para reações padrão foi utilizado um total de 25 µl, sendo: 12,5 µl do mix, 1 µl de primer (F+R), 10,5 µl de água e 1 µl de cDNA. As sequências dos primers para os genes constitutivos foram descritas previamente por McCurley e Callard [29], e os primers para os genes alvo foram desenhados usando a ferramenta do genbank, através do PrimerBlast. As curvas de amplificação e dissociação geradas a partir de software serão usadas para análise da expressão do gene.

Os valores do limiar do ciclo serão obtidos para cada gene. Seguindo a exclusão das amostras não-amplificadas, os dados brutos da fluorescência serão exportados para o software LinRegPCR 12.x para determinar a eficiência da amplificação do PCR em cada amostra. A eficiência do PCR de cada amostra junto com os valores do limiar do

ciclo será usada para calcular o valor da expressão relativa do gene para cada transcripto [28].

Os genes alvo avaliados foram o *Sox9*, *Dmrt1*, *Dax1*, *vtg* (vitelogenina) e *cyp19a* (aromatase), bem como os constitutivos *beta-actin* e *elfa* (*efl-α*), conforme Tabela 1.

1.7 ELISA

Amostras de animais adultos (5 machos e 5 fêmeas de cada grupo) com 90 dpf foram coletadas e armazenadas individualmente. Cada animal foi eutanasiado por resfriamento rápido e teve a cabeça e nadadeira caudal retiradas e o restante do copo foi pesado. Após colocado em nitrogênio líquido e armazenado em *freezer* -20°C. O processamento das amostras foi realizado seguindo o método descrito por Fraz *et al.*, 2018 [17], com adaptações. Para cada animal pesado foi calculado o valor para adição de solução de PBS pH 7,2 ± 1. Após, cada amostra foi homogeneizada e 1 mL da solução foi transferida para um novo tubo, a este tubo foi adicionado 3 mL de éter etílico, congelado em nitrogênio líquido e a porção descongelada transferida para um novo tubo, esta última etapa foi repetida três vezes e, ao final as amostras permaneceram secando em banho maria à 37°C. Kit de ELISA para Testosterona (Kit Testosterone, Enzo Life Science, Catalog n° ADI-900-065) foi utilizado seguindo as instruções do fabricante. Kits de Estradiol, Progesterona, FSH e LH estão sendo analisados e os resultados serão adicionados antes da submissão do artigo. Todos padrões e amostras foram executados em duplicata [30].

1.8 Proporção Sexual

Para a determinação da proporção sexual foram utilizados apenas indivíduos adultos (120 dpf). Cada animal foi eutanasiado por resfriamento rápido e a cavidade celomática foi aberta, com uma tesoura pequena de incisão, por uma incisão ventral a partir da abertura urogenital em direção à cabeça [25] e, as gônadas foram observadas para confirmação do sexo.

Os animais amostrados foram aproveitados para utilização em outros testes, como ELISA e qRT-PCR. A proporção sexual foi estabelecida pelo quociente entre o número de machos e fêmeas e calculada através do teste chi-quadrado no programa Graphpad Prism, versão 6.0.

1.9 Análise Estatística

As taxas de eclosão e sobrevivência foram analisadas pelo teste de Kaplan-Meier. Dados de frequência cardíaca e comprimento do corpo foram avaliados por ANOVA de uma via seguido por teste post-hoc de Tukey. O teste chi-quadrado foi utilizado para calcular a proporção sexual entre os grupos expostos à diferentes temperaturas.

Todas as análises foram feitas usando o software Graphpad Prism, versão 6. Para todas as comparações, foi definido o nível de significância como $p \leq 0,05$ e os dados são apresentados com média \pm desvio padrão.

2. RESULTADOS

2.1 Parâmetros Embrionários

2.1.1 Taxas de Eclosão e Sobrevivência

Para quantificação das taxas de eclosão e sobrevivência foi utilizado o teste de Kaplan-Meier. Como esperado, os embriões expostos a temperaturas mais baixas (24°C), apresentaram um desenvolvimento mais lento se comparado com os embriões mantidos em altas temperaturas (30°C) e na temperatura referência (28°C), tanto nas taxas de eclosão quanto sobrevivência ($p < 0,0001$ para ambos). Os embriões expostos a temperatura de 24°C, quando manipulados começaram a eclodir a partir de 72 hpf (50%), enquanto que os animais mantidos nesta temperatura que não tiveram nenhum tipo de manipulação saíram do córion a partir de 120 hpf (55%), chegando até 144 hpf para muitos indivíduos. Já os embriões expostos à temperatura referência (28°C) em ambas situações com e sem manipulação, em sua maioria estavam fora do córion com 72 hpf (82% e 93%, respectivamente), e a partir de 120 hpf já apresentam a boca em estágio inicial de desenvolvimento, com algumas larvas iniciando sua alimentação. A eclosão dos embriões mantidos na temperatura de 26°C inicia com 72 hpf (94% com manipulação e 20% sem manipulação), enquanto que em 30°C inicia com 48 hpf, eclodindo mais cedo os animais que não foram manipulados (92%). Conforme manipulação o tempo de eclosão altera (Figura 1 A-B).

Em relação à taxa de sobrevivência, quando não houve manipulação, os animais mantidos na temperatura de 24°C sobreviveram menos, enquanto que em 26°C, os animais que foram manipulados tiveram menor taxa de sobrevivência ($p < 0,0001$)

(Figura 1 C-D). De modo geral, a sobrevivência pode ser influenciada por outros parâmetros que não envolvem a manipulação e, assim não terem diferença entre os grupos mantidos em diferentes temperaturas ao longo de 7 dpf.

2.1.2 Batimentos Cardíacos

Para avaliar a frequência cardíaca foi usado o teste ANOVA. Houve diferença significativa entre os grupos em relação à frequência cardíaca de embriões com 48 hpf e larvas com 120 hpf ($p < 0,0001$ para ambos). Tanto embriões quanto larvas mantidas na temperatura de 24°C apresentaram a frequência cardíaca mais baixa quando comparados aos mantidos à temperatura referência (28°C). No grupo mantido à temperatura de 26°C a frequência cardíaca mostrou-se um pouco mais baixa do que a controle, enquanto que na temperatura mais alta (30°C), poucos animais apresentaram uma frequência cardíaca mais rápida do que os animais referência (Figura 2).

2.1.3 Morfologia

A avaliação morfológica e identificação de potenciais alterações teratogênicas foi realizada em embriões com 24 e 48 hpf ($n=20$ em duplicata) e comparada com o padrão morfológico de estagiamento da espécie descrito por Kimmel [31].

A análise de embriões com 24 hpf demonstrou que aqueles mantidos à temperatura mais baixa (24°C) apresentaram 14 somitos, o mesmo apresentado por embriões com 16 hpf mantidos em temperaturas de 28°C, bem como, vitelo semelhantes a embriões com 18 hpf. Estes dados demonstram um atraso no desenvolvimento destes animais em baixas temperaturas quando comparados com embriões mantidos a 28°C. Embriões mantidos em 26°C apresentaram 22 somitos, correspondendo a animais com aproximadamente 22 hpf, demonstrando um pequeno atraso no desenvolvimento. Nos embriões mantidos a 28°C com 24 hpf observou-se o início da pigmentação da pele e da retina, glóbulos vermelhos no vitelo e batimentos cardíacos, correspondendo com as características de animais com 24 horas mantidos nesta mesma temperatura em outros laboratórios. Animais mantidos a 30°C já apresentam a retina pigmentada, evidenciando características de um pouco mais desenvolvidas do que embriões de 24 hpf mantidos na

temperatura padrão descrita por Kimmel [31], mas sem características de embriões com 30 hpf (Figura 3).

Embriões com 48 hpf mantidos à temperatura de 24°C apresentam características de animais com 36 hpf, com pigmentação da cauda e preenchimento da faixa ventral, bem , como, forte circulação e pericárdio não inchado, demonstrando ainda um atraso no desenvolvimento embrionário. Embriões de 48 hpf mantidos em 26°C possuem aspecto similar aos de 42 hpf, na tabela de estagimento usada como referência, com a faixa dorsal completa e pericárdio proeminente. Os embriões da temperatura de 28°C apresentaram características comuns com 48 hpf, com repouso dorsal para cima e cabeça amarela na região posterior. Os embriões de 48 hpf mantidos a 30°C, por sua vez, demonstraram ser mais desenvolvidos do que os com 48 hpf, mas não apresentam características avançadas de embriões com 60 hpf, ocorrendo um desenvolvimento embrionário um pouco acelerado (Figura 4).

Larvas com 14 dpf e juvenis com 21 e 28 dpf (n= 5 por grupo em triplicata) também foram avaliados quanto à morfologia externa. *Zebrafish* de 5 até 18 dpf apresentam o formato do corpo de larva, e a partir de 21 dpf os animais começam a apresentar as nadadeiras bem definidas. Com 14 dpf, 100% dos animais em todos os grupos apresentaram a bexiga natatória com cavidade única. Com 21 dpf, sendo mantidos nas temperaturas de 28°C e 30°C, 40% dos animais analisados começaram a apresentar a bexiga natatória dividida em duas cavidades. Com 28 dpf o *zebrafish* já demonstra característica de juvenis, sendo que a maioria dos animais (95%) possui a bexiga natatória dividida em duas cavidades, em todas as temperaturas experimentais (Figura 5).

O comprimento do corpo de larvas de 14 dpf e juvenis com 21 e 28 dpf apresentaram diferenças entre os grupos mantidos em diferentes temperaturas. Larvas com 14 dpf mantidas em temperaturas mais baixas (24°C) possuem o corpo menor em comparação com os outros grupos (p=0,007). Juvenis com 21 dpf não demonstraram diferenças em relação ao comprimento do corpo entre os grupos (p=0,0609) enquanto os animais com 28 dpf apresentam tamanhos semelhantes entre os grupos, exceto na temperatura de 24°C na qual, alguns indivíduos eram menores, embora esse efeito não tenha sido estatisticamente significativo (p=0,5156) (Figura 6).

2.2 Histologia das gônadas de larvas, juvenis e adultos

A histologia confirmou que o *zebrafish*, no início do seu desenvolvimento, passa por uma fase de hermafroditismo, apresentando gônadas bipotentes até os 35 dpf, com todos os indivíduos apresentando gônadas com características femininas. Após este período, ocorre a determinação do sexo e inicia a diferenciação sexual em macho ou fêmea, normalmente entre 42 dpf e 49 dpf. Com 77 dpf, os animais já apresentam o sexo definido, e aos 90 dpf já estão aptos para reproduzir, apresentando dimorfismo sexual através de características externas (Figura 7). Em temperaturas mais altas (30°C), a diferenciação sexual ocorre de forma precoce em muitos indivíduos, enquanto que em 24°C essa diferenciação ocorre de forma tardia se comparado aos animais criados à 26°C e 28°C.

2.2.1 Fase de hermafroditismo

Nos animais que ainda não tiveram o sexo definido (14 dpf até 35 dpf), há presença de três tipos de células germinativas: oócitos tipo 1, oócitos tipo 2 e oócitos perionucleolares. De acordo com a literatura, sugere-se que as gônadas dos indivíduos que apresentam oócitos tipo 1 e tipo 2, podem ser considerados ovários presuntivos (indiferenciados), ou seja, mais tarde podem degenerar e se tornar testículos. Já os indivíduos que apresentam em suas gônadas os três tipos de células germinativas (oócitos tipo 1 e tipo 2 e oócitos perionucleolares), podem ser considerados como ovários [6]. Neste trabalho a fase de hermafroditismo foi considerada apenas como gônadas indiferenciadas, sem classificar possíveis fêmeas ou machos. Esta fase foi avaliada em etapas sucessivas e caracterizada, como segue.

14 dias pós-fertilização (2 semanas)

Nessa fase o *zebrafish* apresenta células germinativas localizadas em uma pequena porção ao final da bexiga natatória, em vista lateral, sendo denominadas de células germinativas primordiais indiferenciadas (PCGs). Estas características foram encontradas nos quatro grupos experimentais e não apresentaram diferenças nas características das células gonadais.

21 dias pós-fertilização (3 semanas)

As células germinativas permanecem como um pequeno grupo de células ao final da bexiga natatória. Estas células apresentam um número pequeno de células germinativas

em proliferação e gônadas aparentemente com atividade mitótica. Nos animais que apresentam a bexiga natatória dividida em duas porções, as gônadas, em vista lateral, localizam-se na parte ventral da segunda porção da bexiga natatória. Aparentemente estão em estágio inicial de proliferação, apresentando oogonias em transformação e células com atividade mitótica. Em vista ventral, aparecem em par, rodeando a bexiga natatória (Figura 8).

Nessa fase 33% dos animais mantidos à temperatura mais alta de 30°C, apresentaram gônadas com atividade meiótica, característica de animais com 28 dpf, comparado com os animais utilizados como referência. Nos outros grupos experimentais as células ainda apresentavam atividade mitótica.

28 dias pós-fertilização (4 semanas)

Nessa fase a gônada geralmente fica localizada do final da primeira porção até a metade ou ao final da segunda porção da bexiga natatória. Apresentam células tipo 1 e tipo 2, e oócitos perionucleolares. Em alguns animais mantidos às temperaturas de 28°C e 30°C, as gônadas apresentam um aumento de tamanho dos oócitos perionucleolares, característica normalmente encontrada em animais com 35 dpf. Em 24°C e 26°C os oócitos perionucleolares permaneceram sem aumento de tamanho.

35 dias pós-fertilização (5 semanas) – período de determinação sexual

Nos animais nesta fase de desenvolvimento, a gônada geralmente fica localizada do início até o final da segunda porção da bexiga natatória. A gônada apresenta aumento de tamanho dos oócitos perionucleolares, alguns densamente compactados e bem diferenciados e início de atividade meiótica, bem como alguns oócitos tipo 1 e tipo 2. Os animais mantidos em 24°C e 26°C os oócitos perionucleolares tiveram aumento de tamanho e iniciaram o processo de compactação. Nos animais em 28°C e 30°C os oócitos já estão bem compactados e diferenciados, sendo ainda que, em 30°C alguns animais já apresentam características de possíveis gônadas masculinas, com os oócitos entrando no processo de degeneração.

A partir dos 35 dpf, a gônada fica localizada do início ao fim da segunda porção da bexiga natatória.

2.2.2 Diferenciação sexual

Com 42 dpf (6 semanas) as gônadas já estão em processo de diferenciação, e já apresentam características de machos e fêmeas histologicamente. As fêmeas apresentam um grande aumento no número e tamanho dos oócitos perionucleolares, indicando o início do estágio pré-vitelogênico. Enquanto os machos apresentam uma diminuição no tamanho dos oócitos tipo 1 e tipo 2 e início do processo de degeneração das células.

Os animais mantidos em 24°C ainda apresentam aumento no tamanho dos oócitos, mas sem o início do estágio pré-vitelogênico, quando comparados com os animais dos outros grupos experimentais (26°C, 28°C e 30°C) que já apresentam as células gonadais mais desenvolvidas, com início das características de machos e fêmeas.

2.2.3 Definição do sexo

Com 49 dpf (7 semanas) o *zebrafish* apresenta o sexo definido e alguns indivíduos já apresentam as características de dimorfismo sexual. Histologicamente as fêmeas apresentam gônadas com oócitos perionucleolares bem diferenciados, indicando o início do estágio pré-vitelogênico enquanto os machos apresentam gônadas com células indiferenciadas com grande processo de degeneração.

Com 56 dpf (8 semanas) as fêmeas ainda apresentam as gônadas em estágio pré-vitelogênico, exceto os animais mantidos à 30°C nos quais as fêmeas mostram características mais desenvolvidas e células em estágio vitelogênico.

Aos 63 dpf (9 semanas), fêmeas de todos os grupos experimentais apresentam gônadas com células em estágio vitelogênico. Nessa fase, no ovário estão evidentes a oogonia, os oócitos perionucleolares, oócitos alveolares corticais, oócitos pré-vitelogênicos e oócitos vitelogênicos (Figura 9-A), e no testículo há presença de espermatogônia, os espermatócitos (primários e secundários) e as espermátides (Figura 9-B).

2.2.4 Dimorfismo Sexual

Aos 77 dpf (11 semanas) o *zebrafish* já apresenta gônadas bem desenvolvidas, tanto nas fêmeas quanto nos machos e apresenta caracteres externos de dimorfismo sexual facilmente identificáveis para o experimentador treinado. O dimorfismo sexual pode ser percebido tanto na coloração, quanto no formato do corpo, sendo estas as características mais utilizadas para diferenciar fêmeas e machos nesta espécie. Há ainda uma outra

característica que vem sendo utilizada que é a proporção da papila genital. Sua visualização, contudo, é difícil quando os peixes estão em movimento.

As fêmeas apresentam uma coloração prateada, e o corpo arredondado na parte ventral, devido a presença dos ovos. Além disso, as fêmeas maduras sexualmente apresentam uma papila genital, que nada mais é do que uma estrutura proeminente anterior a nadadeira anal, transparente e que cobre a região uro-genital. O ovário é um órgão par, localizado bilateralmente entre a cavidade abdominal e a bexiga natatória, e em vista lateral, o ovário fica por cima da bexiga natatória (externamente) e histologicamente a gônada fica abaixo da bexiga natatória (Figura 10-A).

Já os machos apresentam uma coloração rosada no corpo, principalmente após a alimentação e coloração dourada ou avermelhada nas nadadeiras, mais notavelmente na nadadeira anal. O corpo dos machos possui uma forma de torpedo, sem apresentar saliência na região ventral. Os machos não apresentam a papila genital proeminente como as fêmeas. O testículo é um órgão par, localizado bilateralmente entre a cavidade abdominal e a bexiga natatória, e em vista lateral, o testículo fica abaixo da bexiga natatória tanto externamente quanto histologicamente (Figura 10-B).

2.3 Real Time qRT-PCR

Machos e fêmeas adultos bem como animais com 35 dpf foram utilizados para padronizar o PCR real time. Primeiramente os primers foram testados através de uma PCR convencional através de eletroforese em gel de agarose 1,0% e as respectivas amostras testadas (machos, fêmeas e juvenis) tiveram resultados que sugeriram uma provável contaminação no momento da extração do RNA. Testes para ajustar de modo ideal a PCR real time continua sendo realizado e será adicionado aos resultados antes da submissão.

2.4 ELISA

A padronização dos kits de ELISA humanos já foi realizada e funcionou de forma efetiva para a espécie. Análises finais estão sendo realizadas e os resultados obtidos serão adicionados antes da submissão deste manuscrito.

2.5 Proporção sexual

Para a proporção sexual foram utilizados apenas animais adultos com o sexo confirmado pela análise das gônadas, sendo amostrados aproximadamente 100 animais

por grupo, exceto o grupo exposto à temperatura de 30°C, com menos animais analisados (Tabela 2). O teste chi-quadrado demonstrou que houve diferença na proporção sexual dos grupos mantidos em diferentes temperaturas ($p= 0,0182$; $\chi^2=10,04$).

Observou-se que os animais mantidos à temperatura de 24°C apresentaram uma quantidade relativamente maior de machos (56%). Do mesmo modo, os animais mantidos em 26°C e 28°C, apresentaram maior proporção de machos (65% e 68%, respectivamente). Já os animais mantidos à 30°C demonstraram quase uma proporção sexual ideal, ou seja, de 1:1, com 51% de fêmeas e 49% de machos (Figura 11).

3. DISCUSSÃO

O *zebrafish* vem sendo utilizado nas últimas décadas como um importante animal modelo nas áreas de neurofisiologia e biomedicina, bem como aplicações na indústria farmacêutica. Como o *zebrafish* é uma espécie que vem sendo utilizada em laboratórios há algum tempo, técnicas de reprodução e condições de criação já foram bem estabelecidas [32]. Estas, somadas à conservação de aspectos fisiológicos e genéticos da espécie permitem que os resultados obtidos sejam translacionais para vertebrados mais complexos e humanos [33].

Mesmo com tantos estudos empregando o *zebrafish*, pouco se sabe sobre o real papel da temperatura sobre diversos mecanismos fisiológicos de diferenciação sexual destes animais. Também se sabe pouco sobre como a temperatura influencia o desenvolvimento sexual nestes animais em condições de manutenção estabelecidas para biotérios [11]. Este pouco conhecimento é ainda comprometido pelas diferenças de linhagens utilizadas nos estudos e condições nas quais os animais são mantidos, além do tempo de duração da exposição à determinada temperatura [34], o que leva a muitas dúvidas de como o sexo e a temperatura podem influenciar no restante dos dados analisados ou pretendidos.

Para Westerfield [23], as comparações de embriões criados em diferentes temperaturas devem ser feitas com cautela, pois não há garantia de que todas as

características do embrião alterem de maneira coordenada com suas taxas de desenvolvimento quando a temperatura é alterada. No entanto, os embriões parecem desenvolver-se normalmente se forem mantidos dentro de um intervalo de variação de cerca de 8°C, entre 22°C e 33°C. Incubá-los por longos períodos acima ou abaixo desses extremos pode produzir anormalidades. Segundo ele também, a temperatura ideal para se criar o *zebrafish* é a 28,5°C, em uma densidade de 5-10 embriões por ml.

De acordo com o presente trabalho, animais criados em temperaturas diferentes da considerada ideal para a espécie (28°C), também conseguem sobreviver e se desenvolver, sem anormalidades anatômicas evidentes. Quando criados em temperaturas um pouco mais baixas, em 24°C, no início do desenvolvimento ocorre um atraso na eclosão, no desenvolvimento de características anatômicas consideradas padrão para a espécie, na frequência cardíaca e no processo de desenvolvimento sexual. Enquanto a temperaturas mais altas, de 30°C, eles conseguem se desenvolver e crescer de forma mais rápida.

Em temperaturas consideradas, desta forma, normais (28,5°C), os embriões eclodem até o terceiro dia, 48-72 hpf, e após a eclosão já podem ser chamados de larvas. Durante o período de eclosão, o embrião continua a crescer na mesma taxa que anteriormente, e ao final do período de eclosão a boca se projeta para além do olho, e se abre [23]. Abozaid *et al.* [10] expôs os embriões à temperatura de 35°C e descreveu que quanto mais elevada a temperatura menor foi a taxa de eclosão e sobrevivência dos embriões. Estes resultados estão em oposição aos do presente estudo, no qual observamos diferenças nas taxas de eclosão e sobrevivência de embriões expostos a temperaturas mais elevadas (30°C), nos quais o desenvolvimento foi acelerado, em temperaturas mais baixas (24°C) o desenvolvimento foi retardado.

A TSD neste animal modelo já está bem documentada por diversos trabalhos, porém alguns autores ainda acreditam que o sexo do *zebrafish* se define por fatores genéticos e que este apresenta um sistema de cromossomos sexuais XY [5], no qual a temperatura seria apenas uma consequência apresentando um efeito térmico sobre a GSD. [8,35].

Zebrafish juvenis são considerados peixes protogênicos, que passam por um período inicial de hermafroditismo, pois apresentam gônadas indiferenciadas semelhantes a ovários. Após 30 dpf todos os oócitos desaparecem e inicia-se o desenvolvimento dos espermatozóitos. O desaparecimento dos oócitos é atribuído à

apoptose, ou seja, morte celular programada destas células, o que inicia então a formação dos testículos [3,5,6,9].

Segundo Uchida *et al.* [5], os ovários em *zebrafish* entre 15 e 19 dpf provavelmente sofrem perda programada dos oócitos durante a diferenciação ovariana para eliminar oócitos desnecessários do ovário. No trabalho de Uchida *et al.* [5] a diferenciação sexual inicia entre 21 e 23 dpf e com 40 dpf os indivíduos mantidos a 28,5°C já estão todos com o sexo definido. Estes dados se assemelham com os do presente trabalho, no qual os juvenis com 35dpf iniciam o processo de determinação sexual e com 42 dpf os animais iniciam a diferenciação sexual.

Alguns estudos sugerem que o choque térmico e a pressão hidrostática se ocorrer durante o estágio inicial de desenvolvimento gonadal do embrião, podem resultar em populações com mais machos, devido a reversão sexual causada por estressores ambientais externos, pois estes fatores induzem a apoptose de várias células e podem estar envolvidos também na apoptose dos oócitos durante o processo de diferenciação sexual. [5,36,37,38]. Como neste trabalho os embriões foram mantidos em diferentes temperaturas desde o início do desenvolvimento, não se imagina haver efeitos por choque térmico, mas identificamos alterações na proporção sexual prevista de 1:1 principalmente em temperaturas consideradas ideais (26°C e 28°C) para se manter o *zebrafish*.

Nos trabalhos de Uchida *et al.* [5,9], foi demonstrado que juvenis geneticamente modificados para fêmeas, quando mantidos em temperaturas elevadas, como 35° e 37°C, resultam em uma alta proporção de machos, de 68,8% e 100%, respectivamente. Porém, quando os autores expuseram animais selvagens às mesmas temperaturas com 15 e 25 dpf, não foram observadas mudanças na proporção sexual das populações (dados não publicados, como indicado por Uchida *et al.* [9]). Em contraponto aos achados de Uchida *et al.* [5,9], Sfakianakis *et al.* [8] observou que embriões de *zebrafish* expostos a temperaturas de 22°, 25°, 28° e 31°C, demonstrou que quanto mais elevada a temperatura de exposição, maior é a proporção de fêmeas e baixas temperaturas levam a masculinização da população. Segundo Sfakianakis [8] temperaturas abaixo de 22°C e acima de 34°C são consideradas temperaturas extremas, não sendo possível criar o *zebrafish* em condições normais. Porém, na natureza há uma grande variação nas taxas de temperaturas, entre 19°C e 39°C, sendo estes animais

extremamente resistentes a estas condições [37], o que pode explicar a facilidade de adaptação destes animais em diferentes condições ambientais.

Neste trabalho, a proporção sexual dos animais mantidos em temperaturas mais baixas (24°C) demonstrou um aumento de machos em relação às fêmeas, semelhante ao achado por Sfakianakis *et al.* [8]. Em contrapartida, animais mantidos em temperaturas consideradas ideais para a espécie (28°C), deveriam apresentar uma proporção sexual equilibrada, mas neste trabalho o achado foi um aumento na população de machos em ambas temperaturas de 26°C e 28°C, as mais utilizadas na maioria dos biotérios. Diferentemente do achado por Uchida *et al.* [9], temperaturas mais altas apresentam maior proporção de fêmeas, sendo que neste trabalho os animais mantidos em 30°C tiveram quase que uma proporção ideal. Talvez temperaturas acima de 30°C possam ter uma proporção maior de fêmeas, diferentemente do esperado por muitos autores.

Outro aspecto que difere entre os resultados é o desenho experimental de cada trabalho, já que neles os animais são expostos às diferentes temperaturas e períodos de tempo em diferentes idades, o que impede uma comparação direta dos achados. Nosso estudo, manteve animais à diferentes temperaturas até a idade adulta para avaliar se existe mudanças drásticas durante o desenvolvimento sexual, usando temperaturas que eles estão acostumados na natureza. A maioria do observado em peixes foi através de análises laboratoriais, muitas vezes usando temperaturas que a espécie não está acostumada na natureza, levando à resultados discrepantes.

O sexo do *zebrafish* pode ser alterado em juvenis por manipulações, como altas temperaturas que transformam fêmeas geneticamente em machos fenotípicos, ou aqueles nos quais a proporção de fêmeas pode ser aumentada com um tratamento à base de estradiol [9].

A diferenciação sexual das gônadas também pode estar sob controle de diferentes genes e hormônios que estão envolvidos neste processo, como é o caso da enzima aromatase, a qual já é conhecida por estar envolvida na regulação da diferenciação dos ovários [6].

A presente discussão será complementada a partir dos resultados obtidos das análises que estão em andamento antes da submissão do artigo.

Agradecimentos

Este projeto foi financiado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Número 830432/1999-0) com a concessão de bolsa de Mestrado; Coordenação de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), e o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCTEN)/CNPq, com ajuda financeira para a realização do projeto.

Tabela 1. Sequência dos genes alvo e constitutivos utilizados para avaliar a expressão gênica através do qRT-PCR.

Gene	Sequência	Referência
<i>β-actina</i>	F: CGAGCAGGAGATGGGAACC R: CAACGGAAACGCTCATTGC	McCurley e Callard [29]
<i>Elfa</i>	F: CTTCTCAGGCTGACTGTGC R: CCGCTAGCATTACCCTCC	McCurley e Callard [29]
<i>Dmrt1</i>	F: TAGGCAGTCGCTCCATGTTG R: ACACGTTATGGCTGGACAGG	PrimerBlast
<i>Sox9a</i>	F: TTTGACCAATACCTCCCGCC R: AGGAACCGTAGCTGATGTGC	PrimerBlast
<i>Nr0b1 (Dax1)</i>	F: TCAAACCACATGCAAAGCCG R: GTCCGCTCGTTAAAATCCGC	PrimerBlast
<i>Vtg</i>	F: AGGTCAAGTTCAAGTTCAAGTCA R: AACAGCACGGGCGATGATAC	PrimerBlast
<i>Cyp19a</i>	F: CTATTCTGGTGGCTCTGCTGTCT R: GTTGTGGTTTGCGGGATG	PrimerBlast

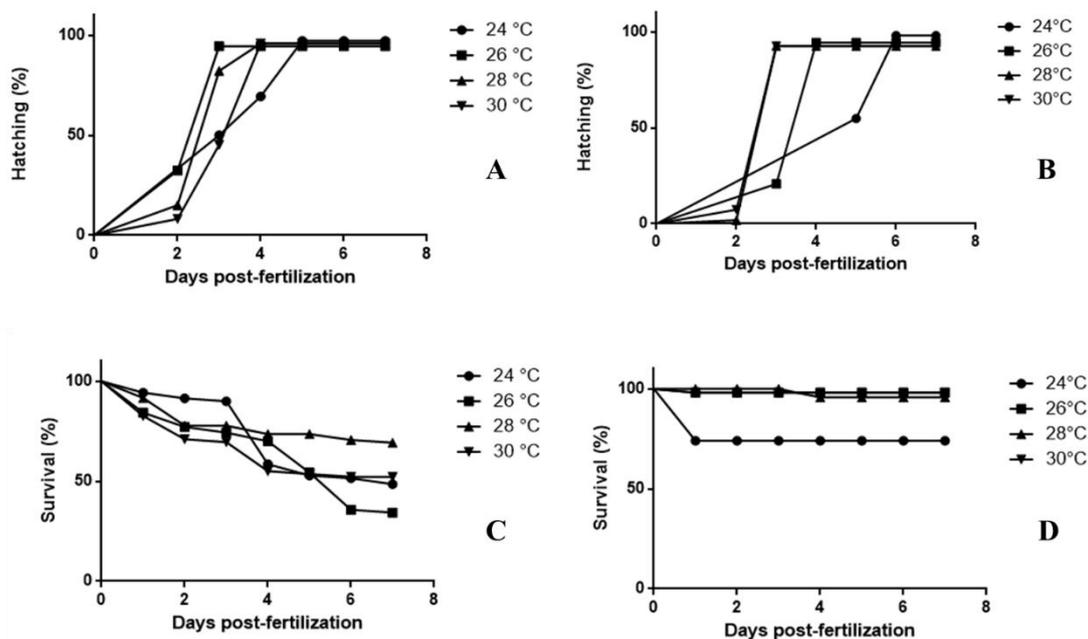


Figura 1. Comparação das taxas de eclosão e sobrevivência entre os diferentes grupos experimentais, com e sem manipulação dos animais pelo experimentador ao longo de 7 dias pós-fertilização. Teste de Kaplan-Meier. **A-** taxa de eclosão com manipulação; **B-** taxa de eclosão sem manipulação; **C-** taxa de sobrevivência com manipulação; **D-** taxa de sobrevivência sem manipulação ($p < 0,0001$; $n = 50$).

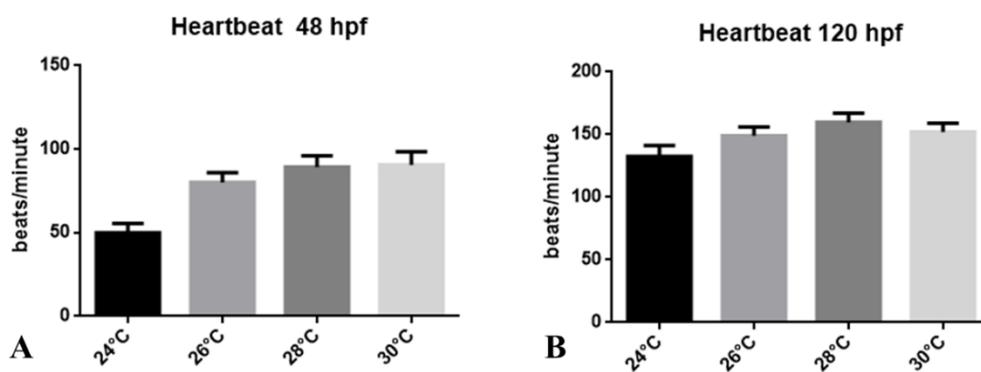


Figura 2. Comparação da frequência cardíacas entre os grupos mantidos em diferentes temperaturas em animais com 48 e 120 horas pós-fertilização. Teste ANOVA. **A-** embriões com 48 horas pós-fertilização; **B-** larvas com 120 horas pós-fertilização ($p < 0,0001$; $n = 50$).

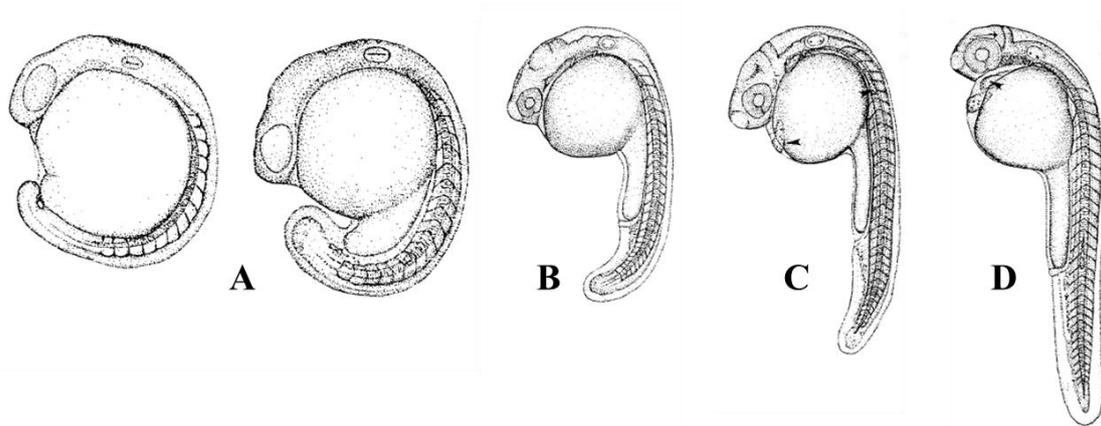


Figura 3. Morfologia dos embriões com 24 horas pós-fertilização nos diferentes grupos experimentais, seguindo a descrição de estagiamento de Kimmel, 1995. **A-** Embrião mantido na temperatura de 24°C apresentando desenvolvimento tardio e com características de embriões com 16 e 18 hpf; **B-** Embrião mantido na temperatura de 26°C com características de embrião com 22 hpf; **C-** Embrião mantido na temperatura de 28°C com 24 hpf; **D-** Embrião mantido na temperatura de 30°C apresentando características de mais de 24 hpf e menos de 30 hpf (n=20). (Fonte: Kimmel [31]).

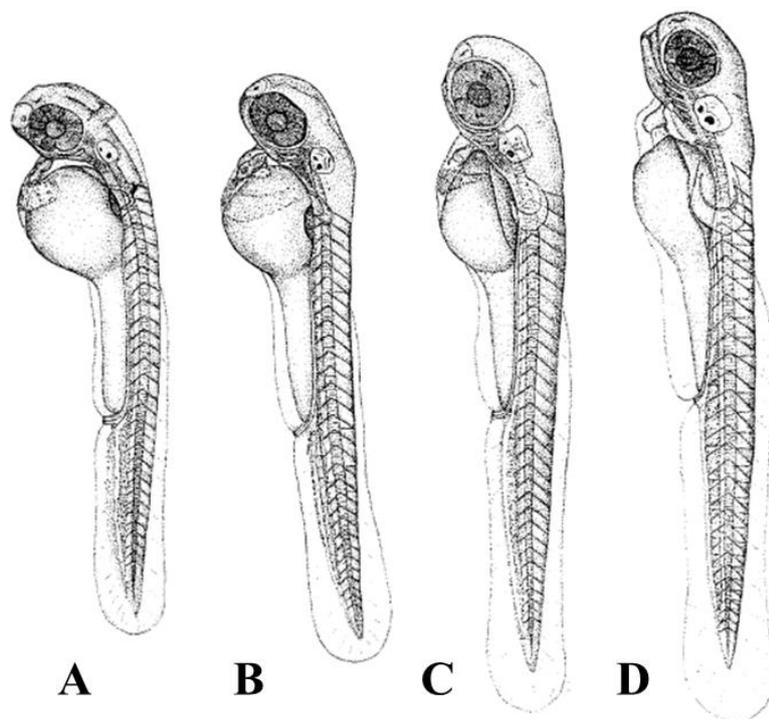


Figura 4. Morfologia dos embriões com 48 horas pós-fertilização nos diferentes grupos experimentais seguindo a descrição de estagiamento de Kimmel, 1995. **A-** Embrião mantido na temperatura de 24°C com características de embrião com 36 hpf; **B-** Embrião mantido na temperatura de 26°C apresentando características de embrião com 42 hpf; **C-** Embrião mantido na temperatura de 28°C com 48 hpf; **D-**

Embrião mantido na temperatura de 30°C com características de embrião com menos de 60 hpf (n=20).
(Fonte: Kimmel [31]).

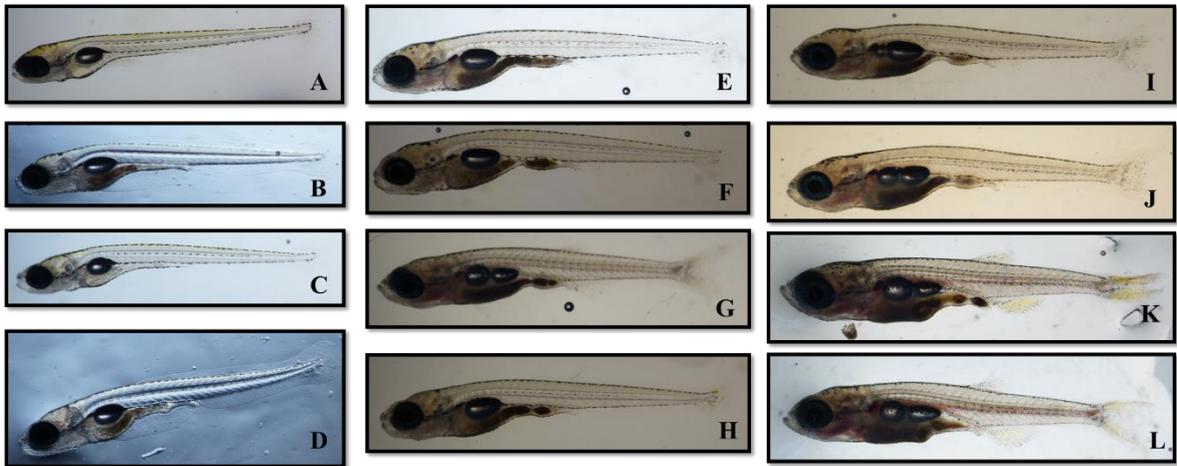


Figura 5. Comparação da morfologia externa de larvas com 14 dias pós-fertilização (A-D) e juvenis com 21 dias pós-fertilização (E-H) e 28 dias pós-fertilização (I-L) quanto a divisão da bexiga natatória nas diferentes temperaturas experimentais (n=5 em triplicata). **A,E,I** = mantidos na temperatura de 24°C; **B,F,J** mantidos em = 26°C; **C,G,K** = mantidos em 28°C; **D-H-L** = mantidos em 30°C.

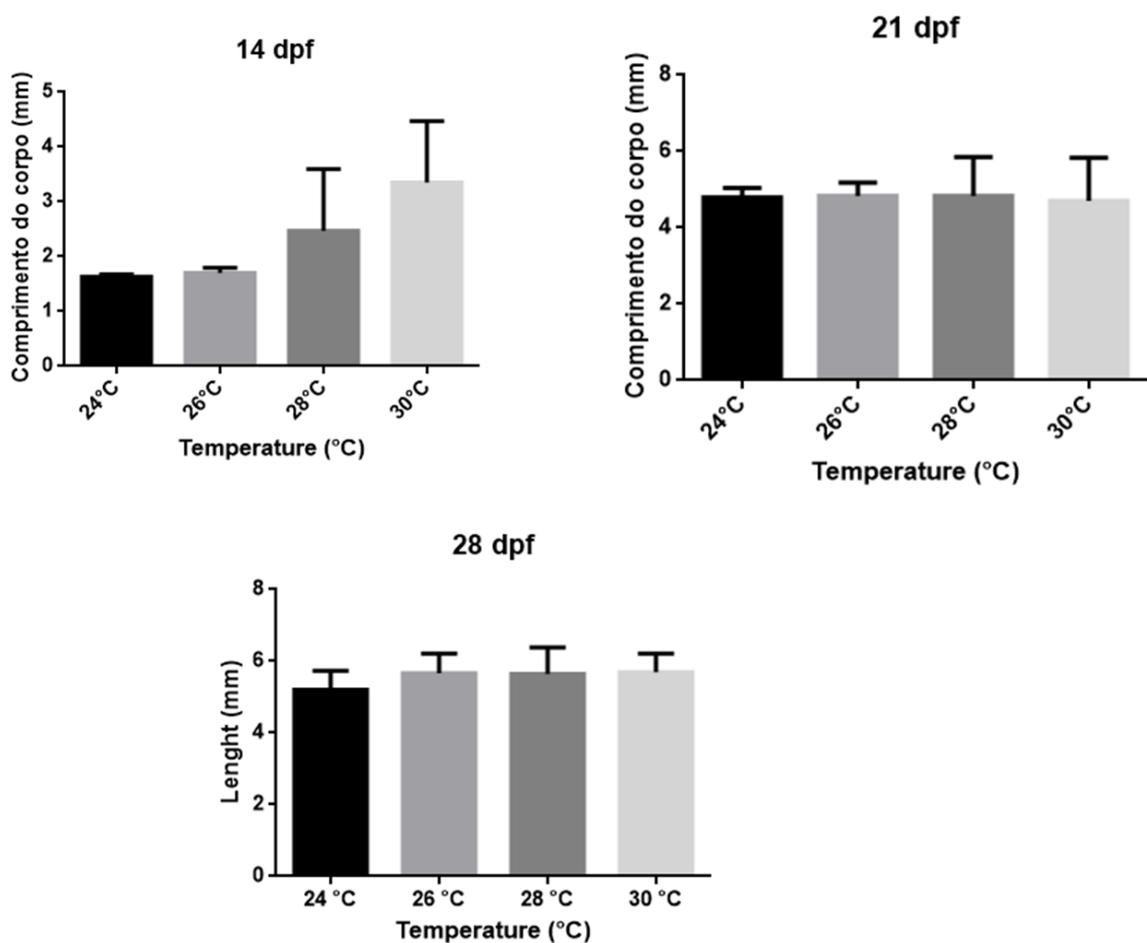


Figura 6. Comparação entre o comprimento do corpo de larvas com 14 dias pós-fertilização e juvenis com 21 e 28 dias pós-fertilização nas diferentes temperaturas experimentais. Larvas com 14 dpf apresentaram diferenças significativas no tamanho do corpo em animais mantidos na temperatura de 24°C e 26°C. Juvenis com 21 e 28 dpf não apresentaram diferenças significativas no tamanho do corpo nos diferentes grupos experimentais. (**14 dpf** $p=0,0070$; $F_{(4 \square 1 \ 2)} = 2,44$; **21 dpf** $p=0,0609$; $F_{(3 \square 1 \ 6)}=3.011$; **28 dpf** $p=0,5156$; $F_{(3 \square 1 \ 6)}=0,7927$; $n=5$ em triplicata).

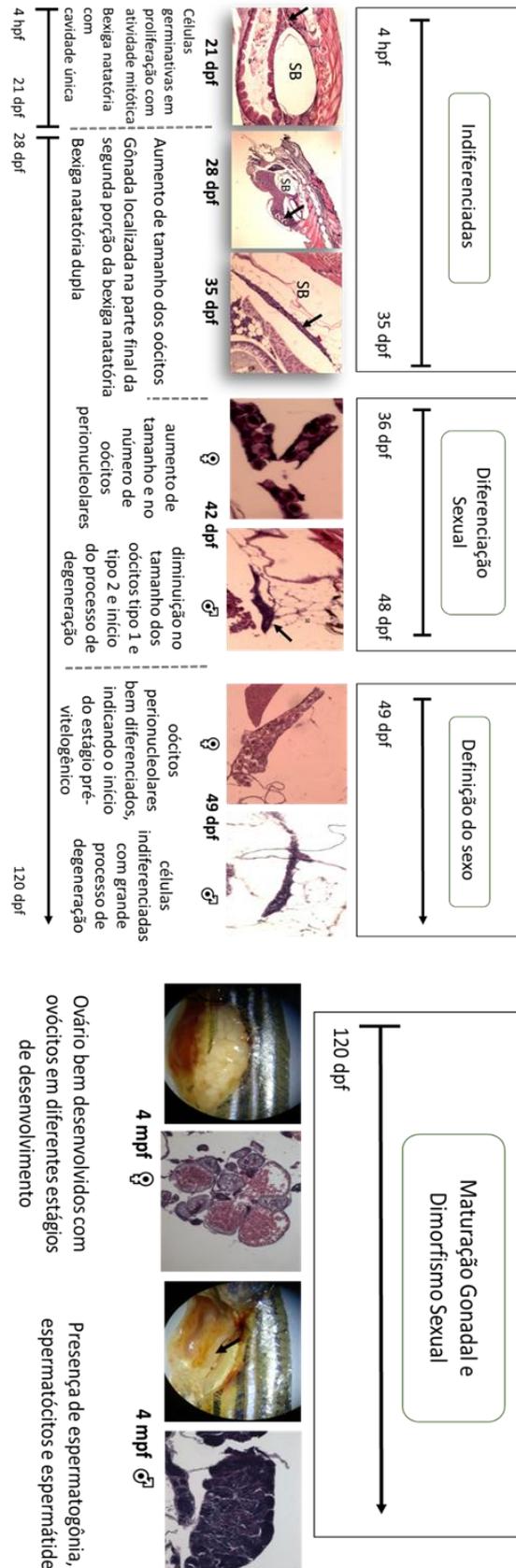


Figura 7. Esquema mostrando o processo de desenvolvimento sexual de *zebrafish* analisados através de histologia e mantidos na temperatura usada como referência (28°C). De 21 dpf até 35 dpf as gônadas podem ser consideradas como indiferenciadas com características de gônadas femininas; Após 35 dpf

ocorre a determinação do sexo e a partir dos 36 dpf até 48 dpf se dá início à diferenciação das gônadas em machos e fêmeas; após 49 dpf o sexo já está definido e com 77 dpf os animais começam a desenvolver características externas de dimorfismo sexual.

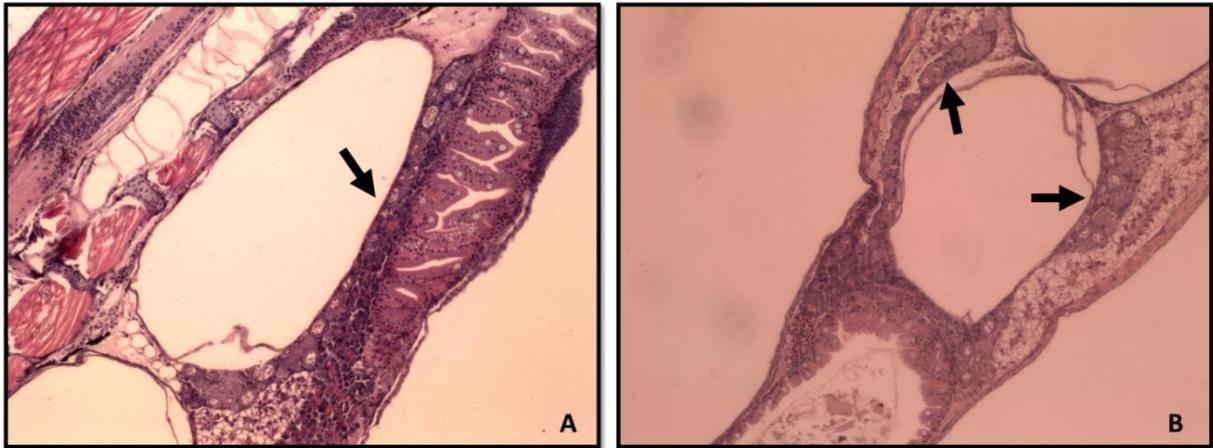


Figura 8. Histologia das gônadas de animais com 21 dias pós-fertilização mostrando a localização das mesmas. **A** – Em vista lateral com células gonadais localizadas abaixo da segunda metade da bexiga natatória; **B**- vista ventral com células gonadais aparecendo em par, rodeando a bexiga natatória. Ambas as fotos são de animais mantidos na temperatura de 30°C.

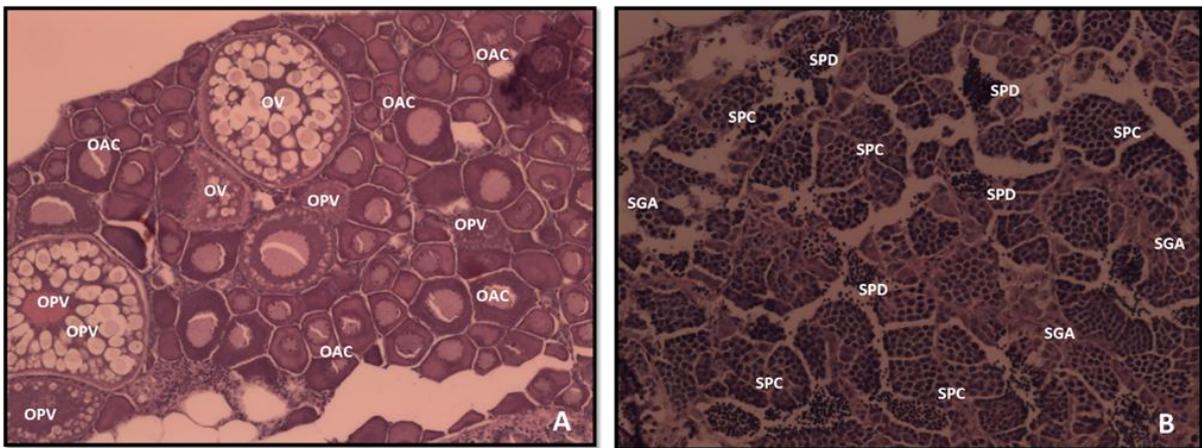


Figura 9. Gônadas de machos e fêmeas com 63 dpf analisados por histologia e expostos a temperatura de 28°C. **A**- gônada de fêmea mostrando a presença de OAC = Oócitos alveolares corticais, OPV = Oócitos pré-vitelogênicos, OV = Oócitos vitelogênicos; **B**- gônada de macho com presença de SGA = espermatogônia, SPC = espermatócitos e SPD = espermátides.

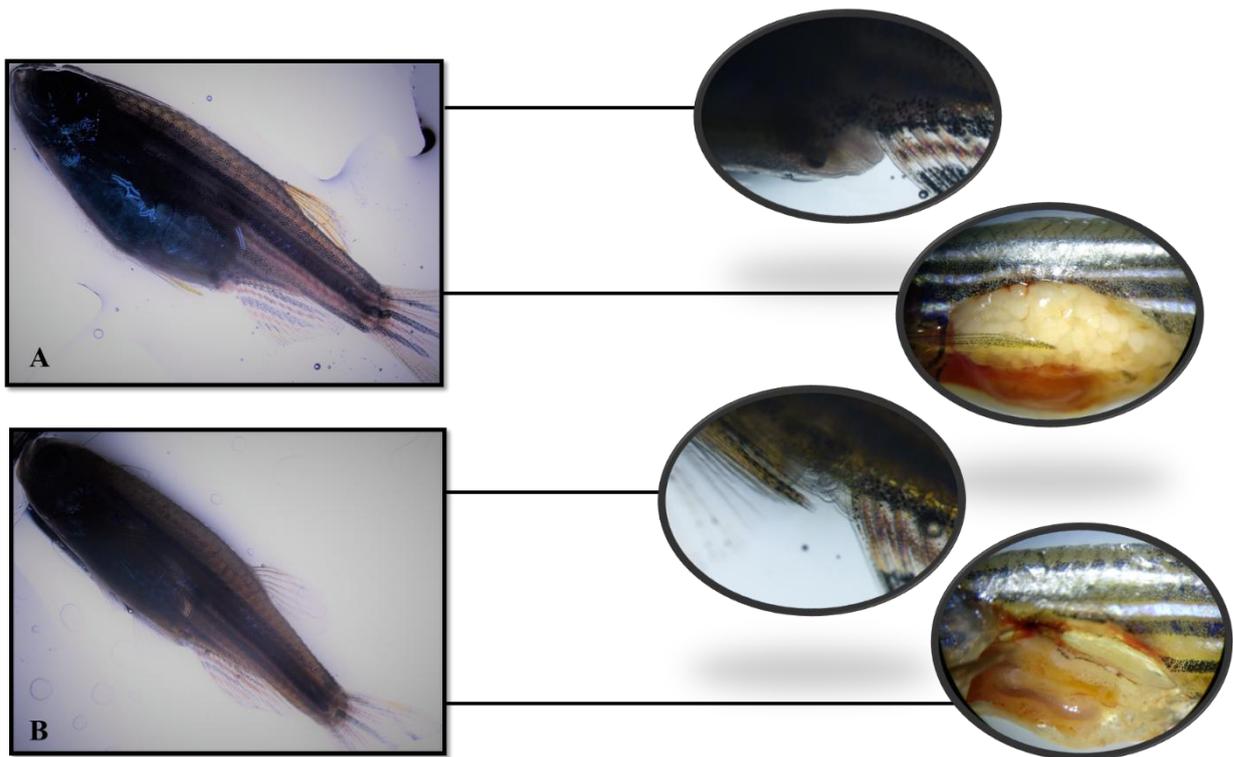


Figura 10. Características de dimorfismo sexual em machos e fêmeas adultos de *zebrafish*. **A-** Fêmea, mostrando a parte ventral com formato abalado e a presença do ovipositor bem como formato das gônadas; **B-** Macho, mostrando o corpo em forma de torpedo sem o ovipositor e com o formato da gônada.

Tabela 2. Quantidade de animais adultos utilizados para calcular a proporção de machos e fêmeas e respectiva proporção sexual através do teste chi-quadrado (ideal 1:1). Os animais mantidos na temperatura de 24°C tiveram uma proporção de 0,76 fêmeas para cada 1 macho. Em 26° e 28°C a proporção ficou semelhante, 0,52 fêmeas para cada 1 macho e 0,46 fêmeas para cada 1 macho, respectivamente. Já em 30°C a proporção foi de 1,02 fêmeas para cada 1 macho.

	24°C	26°C	28°C	30°C
Fêmeas	53	45	42	44
Machos	70	86	91	43
Total	123	131	133	87
Proporção sexual	0,76:1	0,52:1	0,46:1	1,02:1

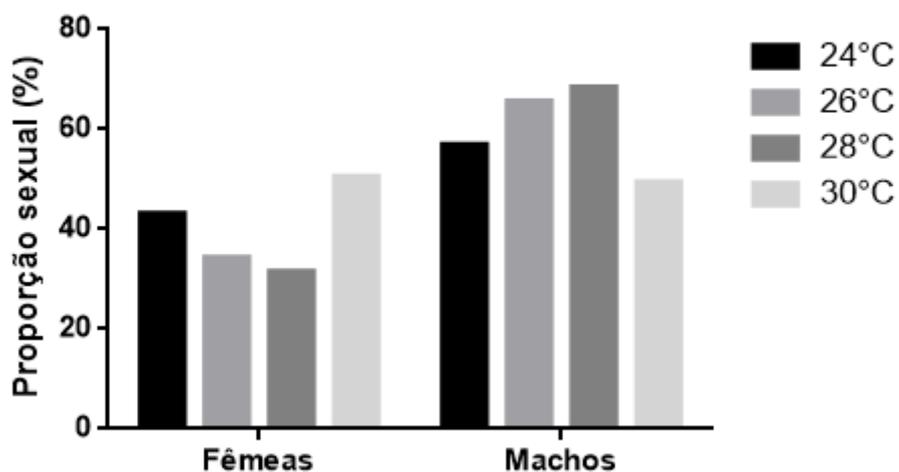


Figura 11. Proporção sexual de machos e fêmeas adultos mantidos em diferentes temperaturas ao longo de 4 meses pós-fertilização através do teste chi-quadrado. ($p= 0,0182$; $\chi^2=10,04$). Animais mantidos na temperatura de 24°C apresentaram maior proporção de machos, bem como os animais mantidos na temperatura de 26°C e 28°C. Já em 30°C, obteve-se quase uma proporção sexual, porém havia presença de mais fêmeas.

REFERÊNCIAS

- [1] Xingang, W (2007). Analysis of gonad differentiation in zebrafish by histology and transgenics. PhD tesis, National University of Singapore, Singapore, AS.
- [2] Siegfried, KR (2010). In search of determinants: gene expression during gonadal sex differentiation. *J. of Fish Biol.* 76, 1879-1902.
- [3] Takahashi, H (1977). Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Bull. Fac. Fish Hokkaido Univ.* 28, 57–65.
- [4] Selman, K., Wallace, RA., Sarka, A., and Qi, aX. (1993). Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Jour. of Morph.* 218, 203-224.
- [5] Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T. and Iguchi, T. (2002). Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *J. Exp. Biol.* 205, 711–718.
- [6] Maack, G. and Segner, H. (2003). Morphological development of the gonads in zebrafish. *J. of Fish Biol.* 62, 895-906.
- [7] Santos, D., Luzio, A. and Coimbra, AM. (2017). Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors. *Aquat. Tox.*, 191, 141-163.
- [8] Sfakianakis, DG., Leris, I., Mylonas, CC. and Kentouri, M. (2012). Temperature during early life determines sex in zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822). *J. of Biol. Res.-Thessaloniki.* 17, 68-73.
- [9] Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T. and Iguchi, T. (2004). An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 137, 11–20.
- [10] Abozaid, H., Wessels, S. and Horstgen-Schwark, G. (2011). Effect of rearing temperatures during embryonic development on the phenotypic sex in zebrafish (*Danio rerio*). *Sex Dev.* 5, 259–265.
- [11] Abozaid, H., Wessels, S. and Horstgen-Schwark, G. (2012). Elevated temperature applied during gonadal transformation leads to male bias in zebrafish (*Danio rerio*). *Sex Dev.* 6, 201–209.
- [12] Brown, AR., Owen, SF., Peters, J., Zhang, Y., Soffker, M., Paull, GC., Hosken, DJ., Wahab, MA. and Tyler, CR. (2015). Climate change and pollution speed declines in zebrafish populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 1237–1246.
- [13] von Hofsten, J. & Olsson, P. E. (2005). Zebrafish sex determination and differentiation: involvement of FTZ-F1 genes. *Reprod. Biol. and Endocr.* 3, 63.

- [14] Jørgensen, A., Morthorst, JE., Andersen, O., Rasmussen, LJ., and Bjerregaard, P. (2008). Expression profiles for six zebrafish genes during gonadal sex differentiation. *Reproduc. Biol. And Endocr.* 1-12.
- [15] Pradhan, A. and Olsson, P. (2015). Zebrafish sexual behavior: role of sex steroid hormones and prostaglandins. *Behav. Brain Funct.* 11, 23.
- [16] Webster, KA., Schach U., Ordaz, A., Steinfeld, JS., Draper, BW., and Siegfried, KR. (2016). *Dmrt1* is necessary for male sexual development in zebrafish. *Develop. Biol.*
- [17] Fraz, S., Lee, AH., and Wilson, JY. (2018). Gemfibrozil and carbamazepine decrease steroid production in zebrafish testes (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 198, 1-9.
- [18] Cheshenko, K., Brion, F., Le Page, Y., Hinfrey, N., Pakdel, F., Kah, O., Segner, H., Rik, IL., and Eggen, RIL. (2007). Expression of zebrafish aromatase *cyp19a* and *cyp19b* genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol. Sci.* 96, 255–267.
- [19] Chiang, EF., Yan, YL., Tong, SK., Hsiao, P., Guiguen, Y., Postlethwait, J., and Chung, B.C., 2001. Characterization of duplicated zebrafish *cyp19* genes. *J. Exp. Zool.* 290, 709–714.
- [20] Lin, Q., Mei, J., Zhang, X., Zhou, L., and Gui JF. (2017). Distinct and cooperative roles of *amh* and *dmrt1* in self-renewal and differentiation of male germ cells in zebrafish. *Genet.*
- [21] Zhao, Y., Yang, Z., Phelan, JK., Wheeler, DA., Lin, S. and McCabe, E.R.B (2006). Zebrafish *dax1* is required for development of the inter-renal organ, the adrenal cortex equivalent. 11, 2630-2640.
- [22] Lau, ES-W., Zhang, Z., Qin, M., and Ge, W. (2016). Knockout of zebrafish ovarian aromatase gene (*Cyp19a1a*) by TALEN and CRISPR/Cas9 leads to all-male offspring due to failed ovarian differentiation. *Sci. Rep.* 6, 37357.
- [23] Westerfield, M. (2007). *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 5^o ed. University of Oregon Press: Eugene, OR.
- [24] CONCEA – Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA. (2013). Disponível em: <file:///C:/Users/D%C3%A9bora/Downloads/DIRETRIZES%20DA%20PR%C3%81TICA%20DE%20EUTAN%C3%81SIA%20DO%20CONCEA.pdf> Acesso em: 02 de maio de 2018.
- [25] Vazzoler AEAM. (1996). *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: EDUEM, 196.
- [26] Okuthe, GE., Hanrahan, S., and Fabian, B. (2014). Early gonad development in zebrafish (*Danio rerio*). *Afric. J. of Biotech.* 13, 3433-3442

- [27] Westerfield, M. (2000). *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio Rerio)*. Institute of Neuroscience. University of Oregon.
- [28] Nery, LR., Eltz, NS., Hackman, C., Fonseca, R., Altenhofen, S. and Guerra HN et al. (2014). Brain intraventricular injection of amyloid- β in zebrafish embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by lithium. *PLoS One*. 9, pag .
- [29] McCurley, AT., and Callard, GV. (2008). Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *Mol. Biol.* 9,102.
- [30] Chu, L., Li, J., Liu, Y., and Cheng, CHK. (2015). Gonadotropin signaling in zebrafish ovary and testis development: insights from gene knockout study. *Mol. Endocrinol.*
- [31] Kimmel, CB., Ballard, WW., Kimmel, SR., Ullmann, B., and Schilling, TF. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Develop. Dynam.* 203-253.
- [32] Hill, AJ., Teraoka, H., Heideman, W., and Peterson, RE. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci.* 86, 6-19.
- [33] Matthews, M., Trevarrow, B., and Matthews, J. (2002). A virtual tour of the guide for zebrafish users. *Lab. Animal.* 31, 34-40.
- [34] Piferrer F: Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197.
- [35] Ospina-Álvarez, N., and Piferrer, F. (2008). Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *Plos One*. 3.
- [36] Onozato, H. (1984). Diploidization of gynogenetically activated salmonid eggs using hydrostatic pressure. *Aquaculture* 43, 91-97.
- [37] Chan, S. T. H. and Yeung, W. S. B. (1983). Sex control and sex reversal in fish under natural conditions. In *Fish Physiology*, vol. 9, part B (ed. W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson), pp. 171-222. New York: Academic Press.
- [38] Yabu, T., Todoriki, S. and Yamashita, M. (2001). Stress-induced apoptosis by heat shock, UV and g-ray irradiation in zebrafish embryos detected by increased caspase activity and whole mount TUNEL staining. *Fish. Sci.* 67, 333-340.

CAPÍTULO 2

Artigo Científico 2: “Determinação sexual de natimortos de duas espécies de tartarugas marinhas (*Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*) através de análise histológica”

Highlights:

- Diferença na textura das gônadas entre os sexos, mas não entre as duas espécies;
- Em *Caretta caretta* parece existir uma relação entre o comprimento curvilíneo da carapaça com o tamanho das gônadas de filhotes recém eclodidos;
- Em *E.imbricata* parece existir uma alta correlação entre o comprimento curvilíneo da carapaça e a distância pré-cloacal;
- A proporção sexual, mesmo com um pequeno n amostral, apresentou um maior número de fêmeas para ambas espécies.

**Determinação sexual de natimortos de duas espécies de tartarugas marinhas
(*Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*) através de análise histológica**

Amanda Bungi Zaluski^{1,2}, Hugo Leonardo Rossiter Peixoto dos Santos³, Arley Cândido da Silva³, Fabio dal Moro Maito⁴, Monica R.R.M. Vianna^{1,2}

¹ Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil. e-mail: amanda.zaluski@acad.pucrs.br

² Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6681, 90619-900, Porto Alegre – RS, Brasil.

³ ONG Ecoassociados. Rua Caraúna, S/N, Praça 4, Porto de Galinhas – PE, Brasil.

⁴ Laboratório de Patologia Bucal, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

RESUMO

As tartarugas marinhas possuem a determinação sexual dependente da temperatura. Durante o tempo de incubação dos ovos, há um período termossensitivo no qual, ocorre a diferenciação das gônadas. A maturidade sexual ocorre em média aos 25 anos, antes desse período, não há dimorfismo visível tornando a histologia a técnica mais apropriada para determinação sexual. Este trabalho objetivou determinar o sexo de indivíduos natimortos de duas espécies, *Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata* a fim de correlacionar o tamanho da carapaça com o tamanho e o grau de desenvolvimento das gônadas e assim contribuir com novos parâmetros que possam ser usados na determinação do sexo destes indivíduos em fases iniciais. As coletas foram realizadas durante o período reprodutivo, (fevereiro a julho de 2018 e dezembro a fevereiro de 2019), em Porto de Galinhas - Ipojuca/PE, através do monitoramento dos ninhos realizado pela ONG Ecoassociados. Foram analisados até o momento dez natimortos de *E. imbricata* pertencentes a nove ninhos, com idade entre 51 e 67 dias, e 4 natimortos de *C. caretta* de 2 ninhos, com idade entre 39 e 43 dias. Após a coleta, os natimortos foram fixados, fotografados e medidos. O plastrão foi aberto e as gônadas foram retiradas e analisadas quanto à textura e à histologia. Foram feitas regressões lineares para correlacionar o comprimento curvilíneo da carapaça com o tamanho das gônadas entre as duas espécies. Entre as espécies há uma pequena diferença em relação ao tamanho das gônadas, sendo que a maioria dos filhotes de *C.caretta* apresentaram

um tamanho maior em relação a *E.imbricata*. Isto pode decorrer do fato de os filhotes de *C.caretta* eclodirem antes, com aproximadamente 45 dias, enquanto que *E.imbricata*, eclode com 50 dias ou mais. Quanto à análise macroscópica das gônadas, houve diferença na textura das mesmas entre os sexos, mas não entre as duas espécies. Os achados histológicos corroboram com o de outros autores. Os resultados ainda são preliminares, necessitando de um número maior de indivíduos tanto para a caracterização morfológica e histológica das gônadas quanto para tentar determinar uma proporção sexual parcial dentro da população amostrada.

Palavras-chave: biologia do desenvolvimento; gônadas; tartaruga-cabeçuda; tartaruga-de-pente; morfologia.

INTRODUÇÃO

Assim como outras espécies de répteis, as tartarugas marinhas apresentam a determinação sexual dependente da temperatura (TSD) [1]. Ao longo do período de incubação dos ovos, que dura em torno de 60 dias dependendo da espécie, existe um período termossensitivo, no qual ocorre a diferenciação das gônadas (terço médio de incubação) [2]. Há ainda, uma temperatura determinante, chamada temperatura pivotal, que resulta em uma proporção de 1:1, ou seja, 50% de fêmeas para 50% de machos [3]. Se a temperatura durante o terço médio de incubação estiver mais elevada do que a temperatura pivotal do ninho (acima de 31°C), então teremos prevalência de fêmeas, mas se a temperatura estiver mais baixa do que a temperatura pivotal, teremos um número maior de machos (entre 28 e 30°C) [4,5].

As tartarugas marinhas atingem a maturidade sexual tardiamente, em média aos 25 anos e a partir desse momento elas podem apresentar dimorfismo sexual, que se caracteriza pelo maior comprimento da cauda e maior tamanho das unhas, nos machos. Antes desse período, esse dimorfismo não é visível, sendo ausente em filhotes e juvenis [6,7].

Existe uma grande dificuldade de caracterização sexual nos indivíduos deste grupo, principalmente os jovens em estados de desenvolvimento prévios aos de acasalamento, devido à ausência de cromossomos sexuais heteromórficos [7,8,9], uma vez que os

genes envolvidos tanto na determinação quanto na diferenciação sexual destes organismos encontram-se distribuídos na cromatina.

Há ainda grande discussão em relação à melhor técnica para se determinar o sexo destes animais e a histologia continua sendo a mais apropriada, uma vez que, consegue distinguir machos e fêmeas em diferentes estágios de desenvolvimento e não se trata de um método de coleta caro [7,10,11,12]. Porém em indivíduos vivos é considerado um método invasivo, e quando realizada em animais mortos pode ser comprometida por dificuldades como o estágio de decomposição da carapaça e dos órgãos. Além disso, é considerado o método mais preciso para sexar filhotes recém-nascidos [2,13,14], permitindo estimar a proporção sexual regional e contribuindo para melhor entendimento da biologia das tartarugas marinhas [7].

Estudos recentes têm demonstrando que também é possível identificar o sexo de filhotes e juvenis através de uma combinação de caracteres, avaliando a morfologia externa das gônadas [7]. As características avaliadas são principalmente: o formato e o tamanho das gônadas, a presença de ducto paramesonéfrico e a fixação das gônadas, bem como a textura da superfície e a coloração das mesmas, sendo as últimas características um pouco menos confiáveis para identificação sexual [7,15].

Nesse contexto, o presente trabalho determinou o sexo de indivíduos natimortos de duas espécies (*Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*) a fim de correlacionar o tamanho da carapaça com o tamanho e o grau de desenvolvimento das gônadas e assim contribuir para o desenvolvimento de estratégias que permitam a caracterização sexual destes indivíduos em fases iniciais.

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Área de Estudo e Licenças

A área de estudo localiza-se no município de Ipojuca, a 57 km de Recife, com coordenadas geográficas de 08°24'06"S e 35°03'45"W. Apresenta 32 km de área litorânea, sendo que em 12 km há monitoramento pela ONG Ecoassociados (instituição que objetiva proteger e conservar as tartarugas marinhas no litoral sul de Pernambuco), que vem registrando desovas de tartarugas marinhas nas praias de Muro Alto, Cupe, Merepe, Porto de Galinhas, Maracaípe e Pontal de Maracaípe [16,17] (Figura 1).

Em Pernambuco, a principal espécie encontrada é a tartarga-de-pente (*Eretmochelys imbricata*), cerca de 90% dos ninhos encontrados pertencem a esta espécie. Durante a temporada reprodutiva que ocorre de outubro a julho, ninhos de outras três espécies também são registrados, dentre elas: *Caretta caretta*, *Chelonia mydas* e *Lepidochelys olivacea* [16].

O presente trabalho foi aprovado pelo SISBio para coleta e transporte dos animais e as análises foram realizadas no Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso da PUCRS, e por serem filhotes encontrados mortos nos ninhos não foi necessária a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.

1.2 Coleta e Processamento das Amostras

As coletas foram realizadas durante o período reprodutivo, entre os meses de fevereiro a julho de 2018 e de dezembro a fevereiro de 2019, em Porto de Galinhas - Ipojuca/PE, através do monitoramento dos ninhos realizado pela ONG Ecoassociados. Foram analisados dez natimortos de *E. imbricata* pertencentes a nove ninhos, variando a idade entre 51 e 67 dias, e 4 natimortos de *C. caretta* pertencentes a 2 ninhos, variando de 39 a 43 dias de idade (Tabela 1).

Após a coleta, os natimortos foram fixados em formolaldeído 10% tamponado por 48 horas e, em seguida, foram acondicionados em álcool 70% até o dia da necropsia. Cada natimorto foi fotografado e medido com uma fita métrica quanto ao: Comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), a largura curvilínea da carapaça (LCC), o comprimento do plastrão (CP), o comprimento total da cauda (CTC), o comprimento pré-caudal (CpreC), o comprimento pós-caudal (CposC) e o tamanho do segundo par de unhas da nadadeira anterior, direita e esquerda (TU) (Figura 2).

1.3 Análise das Gônadas

1.3.1 Morfologia Externa das gônadas

Para a retirada das gônadas, cada animal passou por um processo de necropsia. O plastrão foi aberto com o auxílio de um bisturi e as gônadas foram retiradas. Neste estudo tomou-se a gônada direita como padrão.

Logo após a retirada das gônadas, as mesmas foram fotografadas em uma lupa (ZEISS, modelo Stemi DV4) e analisadas quanto sua morfologia externa, em relação a textura das gônadas, as quais foram divididas em lisa ou rugosa. O comprimento total de cada gônada foi medido usando o software ImageJ (Figura 3).

1.3.2 Análise Histológica

Após uma das gônadas foi cortada na porção medial transversal e o tecido passou por um processo de desidratação através da imersão em álcool com uma série de concentrações graduais, posteriormente passou por um processo de diafanização em xilol, e depois pela impregnação em parafina (emblocamento). Os blocos foram cortados a 4 μm em um micrótomo (Lupetec, modelo MRP-09) e as lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE) e montadas com Entellan.

As lâminas foram observadas em um microscópio óptico, a fim de identificar o sexo e o estágio de maturação das gônadas. Em filhotes recém-nascidos os critérios foram baseados na diferenciação da medula e do córtex, nos machos foram observadas a presença dos túbulos seminíferos e nas fêmeas os folículos ovarianos.

1.4 Análise Estatística

Para as análises de correlação foram feitas regressões lineares no programa GraphpadPrism 6.0 a fim de correlacionar o comprimento curvilíneo da carapaça com as outras medidas realizadas das duas espécies.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ambas espécies apresentam o tamanho da carapaça semelhantes, para *C.caretta* (Tabela 2) a média de tamanho da carapaça foi de 4,55 cm \pm 0,33, enquanto os natimortos de *E.imbricata* (Tabela 3) apresentaram uma média de 4,5 cm \pm 0,18. Nas duas espécies as gônadas estão localizadas dentro da cavidade celômica, abaixo dos pulmões e sobrejacente aos rins, podendo ser observadas a olho nu (Figura 4). Entre as espécies notou-se uma pequena diferença em relação ao tamanho das gônadas (Tabela 2 e 3), no qual a maioria dos filhotes de *C.caretta* apresentaram visualmente um tamanho maior em relação aos filhotes de *E.imbricata*. Isto pode se dar ao fato, de que, os filhotes de *C.caretta* eclodem antes, com aproximadamente 45 dias, enquanto que

E.imbricata, eclodem em média com 54 dias [16,17]. Assim, filhotes que eclodem mais cedo desenvolvem os órgãos mais rapidamente.

Quanto a análise externa das gônadas, foi possível notar uma diferença na textura das mesmas entre os sexos, mas não entre as duas espécies. Em alguns filhotes as gônadas apresentaram um aspecto irregular nas bordas e aparência rugosa (Figura 5A), estas foram classificadas como fêmeas, enquanto os outros apresentaram gônadas com um formato alongado e fusiforme, sem bordas e com aparência lisa, sendo classificadas como de machos (Figura 5B). As mesmas, foram confirmadas através da análise histológica. Estes dados relacionados à textura das gônadas se assemelham aos encontrados por outros autores, tanto em filhotes, quanto em animais juvenis e adultos [7,13,15,18,19].

Os achados histológicos também corroboram com o encontrado por outros autores. Em *C.caretta* o ovário apresenta-se bem desenvolvido e com uma medula desorganizada, enquanto que os testículos apresentam uma camada única de células simples e uma medula bem desenvolvida com túbulos seminíferos [7]. Já em *E.imbricata* as fêmeas também possuem a presença de um córtex bem desenvolvido e a medula densa e mal organizada, e os machos apresentam a medula com túbulos seminíferos e o córtex pouco desenvolvido [17] (Figura 5). Estes resultados podem ser explicados devido ao fato, que ambas espécies pertencem a família Cheloniidae, e apresentam o mesmo padrão de gônadas, tanto macro quanto microscopicamente.

Através de regressão linear, notou-se que apenas *C.caretta* apresenta um resultado significativo ($p=0,0172$; $r^2= 0,9659$), ou seja, que há uma relação entre o CCC e o tamanho das gônadas, quanto maior o filhote maior o tamanho das gônadas. Já em *E.imbricata* não parece existir esta relação com filhotes recém eclodidos ($p=0,9187$; $r^2= 0,0013$) (Figura 6). Alguns autores afirmam que embriões de tartarugas expostos à condições de alta umidade em períodos longos de incubação durante o desenvolvimento, poderiam crescer mais rapidamente do que embriões incubados em ninhos sem grandes condições de umidade [20]. Do mesmo modo, que quanto menor a capacidade dos embriões de realizarem trocas gasosas, o mesmo cresce mais lentamente, sendo que as taxas de crescimento podem ter um efeito sobre as diferenças nas dimensões da carapaça entre os indivíduos [21].

Outras possíveis correlações também foram testadas. Em *E.imbricata* parece existir uma alta correlação entre o comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) e a distância pré-cloacal (CpreC) ($p=0,0298$; $r^2=0,4652$), porém não há correlação entre o CCC e o comprimento total da cauda (CTC) ($p=0,2860$; $r^2=0,1404$). Por outro lado, *C.caretta*, não apresentou nenhum tipo de correlação entre o CCC e a distância pré-cloacal ($p=0,8966$; $r^2=0,0107$), do mesmo modo com o comprimento total da cauda ($p=0,7639$; $r^2=0,0557$) (Figura 7).

Não foi possível calcular a proporção sexual, devido ao pequeno n amostral. Porém, deu para perceber que os ninhos em Porto de Galinhas de ambas espécies, apresentaram um maior número de fêmeas, corroborando com o achado de Simões et al. [17]. *C.caretta* de 4 filhotes, três são fêmeas e apenas um macho, e *E.imbricata*, dos 10 filhotes, oito são fêmeas e apenas dois machos.

Devido à difícil identificação do sexo tanto em filhotes quanto juvenis e adultos, novos métodos são necessários para tentar distinguir esses indivíduos. Alguns estudos recentes sugerem utilizar a medida de comprimento que vai do final do plastrão até o início da cloaca, sendo esta uma potencial alternativa para sexar filhotes recém-nascidos [19].

Os resultados deste trabalho ainda são preliminares, necessitando de um número maior de indivíduos, tanto para a caracterização morfológica e histológica das gônadas, quanto tentar determinar uma proporção sexual. Mas assim mesmo, demonstra que ao nascerem os filhotes já estão com o sexo definido e a histologia continua sendo a técnica mais confiável de identificação, porém necessita que os animais estejam mortos. Para próximos trabalhos seria importante realizar medidas de temperatura e umidade, para tentar correlacionar estes dados com algum possível parâmetro de dimorfismo sexual em filhotes.

Agradecimentos

Os autores agradecem à ONG Ecoassociados pelo apoio e auxílio nas coletas. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Número

830432/1999-0) pela concessão de bolsa de mestrado à A.Z; À Coordenação de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), e o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCTEN)/CNPq, pelo apoio financeiro para a realização do projeto.

Tabela 1. Natimortos coletados por ninhos e analisados até o momento, com o respectivo local de coleta e idade aproximada.

<i>Eretmochelys imbricata</i>				
Número do Ninho	Natimortos Coletados	Praia de coleta	Idade Aproximada	Mês/ano da coleta
5	1	Merepe	51-56 dias	fev-18
6	2	Merepe	51-55 dias	fev-18
16	1	Merepe	51-56 dias	mar-18
21	1	Muro Alto	51-54 dias	mar-18
91	1	Muro Alto	54-58 dias	abr-18
101	1	Merepe	54-61 dias	abr-18
104	1	Muro Alto	53-59 dias	abr-18
105	1	Merepe	56-62 dias	abr-18
185	1	Maracaípe	65-67 dias	jul-18
<i>Caretta caretta</i>				
Número do Ninho	Natimortos Coletados	Praia de coleta	Idade Aproximada	Mês/ano da coleta
18	2	Muro Alto	39-40 dias	fev-18
41	2	X	43-46 dias	mar-18



Figura 1. Localização da área de coleta dos natimortos de *Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*. Porto de Galinhas, PE, Brasil.

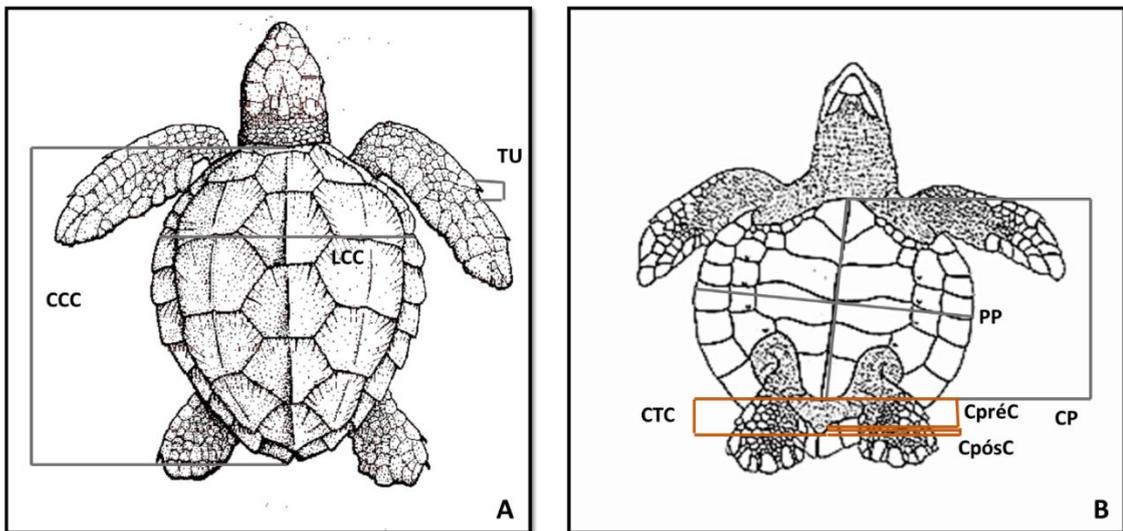


Figura 2. Esquema das medidas corporais realizadas em cada natimorto. A – carapaça: Comprimento curvilíneo da carapaça (CCC); Largura curvilínea da carapaça (LCC); tamanho do segundo par de unhas da nadadeira anterior direita e esquerda (TU); B – plastrão: Comprimento do plastrão (CP); Profundidade do plastrão (PP); Comprimento pré-caudal (CpreC); Comprimento pós-caudal (CposC); Comprimento total da cauda (CTC).

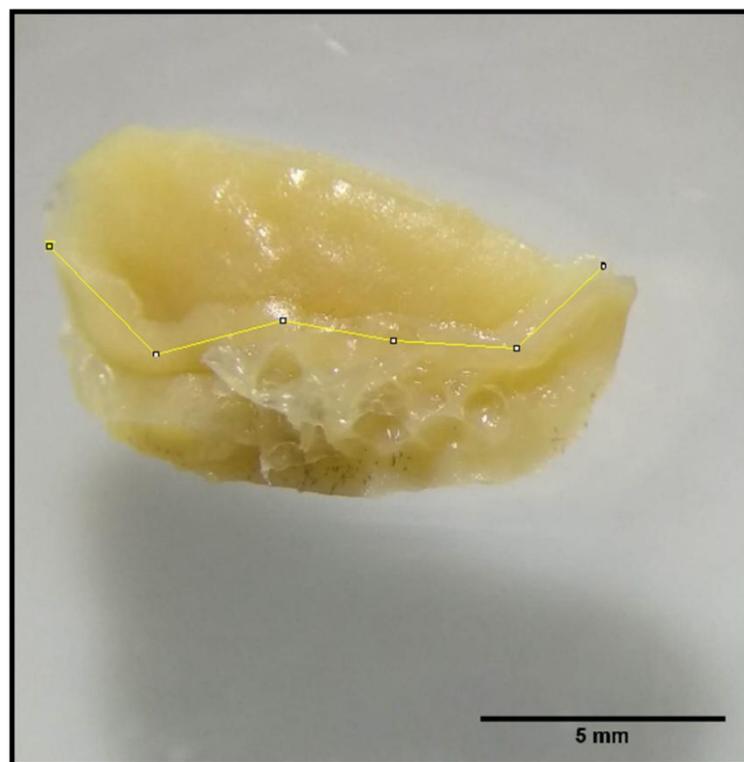


Figura 3. Exemplo de medição da gônada de *Eretmochelys imbricata* usando o Programa ImageJ.

Tabela 2. Medidas encontradas em natimortos de *Caretta caretta* com os respectivos valores de média \pm desvio padrão.

<i>Caretta caretta</i>					
Caracteres (cm)/ N° ninho	N18 1	N18 2	N41 1	N41 2	Média \pm DP
CCC	4,6	4,5	3,9	4,6	4,55 \pm 0,33
LCC	4	4	4	4	4 \pm 0
CP	3	3	2,9	2,8	2,95 \pm 0,09
PP	3,4	3,2	3,9	3,4	3,4 \pm 0,29
CTC	0,7	1	0,9	0,9	0,9 \pm 0,12
CpreC	0,4	0,6	0,5	0,6	0,55 \pm 0,09
CposC	0,3	0,4	0,4	0,3	0,35 \pm 0,05
TU direita	0,2	0,3	0,2	0,3	0,25 \pm 0,05
TU esquerda	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3 \pm 0,05
Gônada direita	0,05	0,06	0,08	0,053	0,0565 \pm 0,01

Tabela 3. Medidas encontradas em natimortos de *Eretmochelys imbricata* com os respectivos valores de média \pm desvio padrão.

<i>Eretmochelys imbricata</i>												
Caracteres (cm)/Nº ninho	N5 1	N6 1	N6 2	N16 1	N21 1	N91 1	N101 1	N104 1	N105 1	N185 1	Média ± DP	
CCC	4,1	4,5	4,4	4,3	4,6	4,4	4,5	4,6	4,5	4,8	4,5 ± 0,18	
LCC	3,8	3,8	4,1	4	4,4	4	4	4,2	4,1	4,4	4,05 ± 0,20	
CP	3,2	3,3	3,5	3,2	3,7	3,3	3	3,3	3,8	3,5	3,3 ± 0,24	
PP	3,4	3,4	3,6	3,9	3,9	3,4			3,7	3,5	3,55 ± 0,21	
CTC	0,9	0,9	1,1	1	0,9	1	1	1	1	1,1	1 ± 0,07	
Cprec	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	0,65 ± 0,09	
Cposc	0,4	0,4	0,5	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3 ± 0,70	
TU direita	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3 ± 0,03	
TU esquerda	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3 ± 0,03	
Gônada direita	0,058	0,05	0,042	0,052	0,05	0,058	0,048	0,05	0,05	0,06	0,05 ± 0,005	

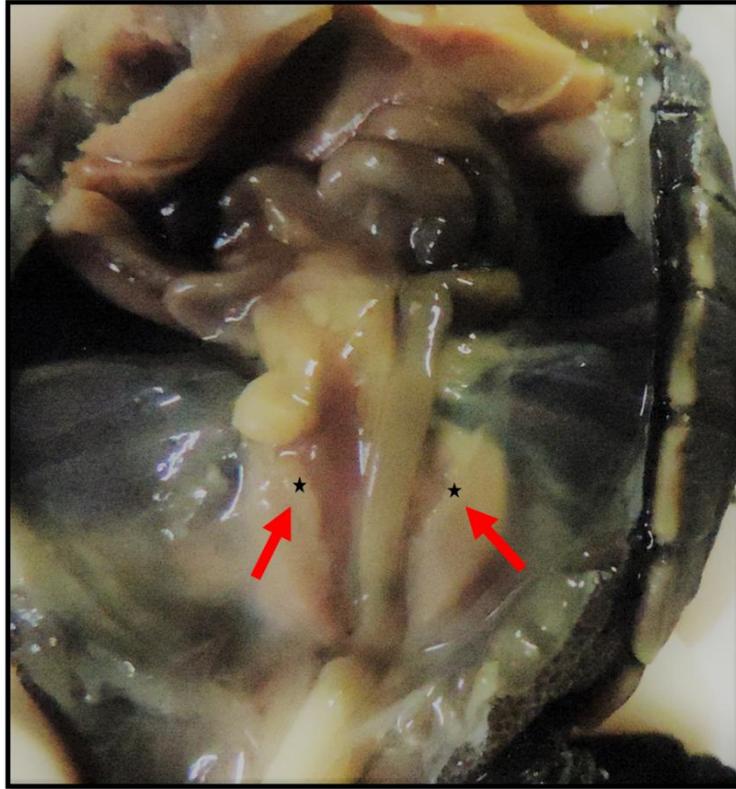


Figura 4. Gônada de filhote natimorto de *Eretmochelys imbricata* com setas indicando a localização das gônadas na cavidade celômica. ★ Representa o local das gônadas.

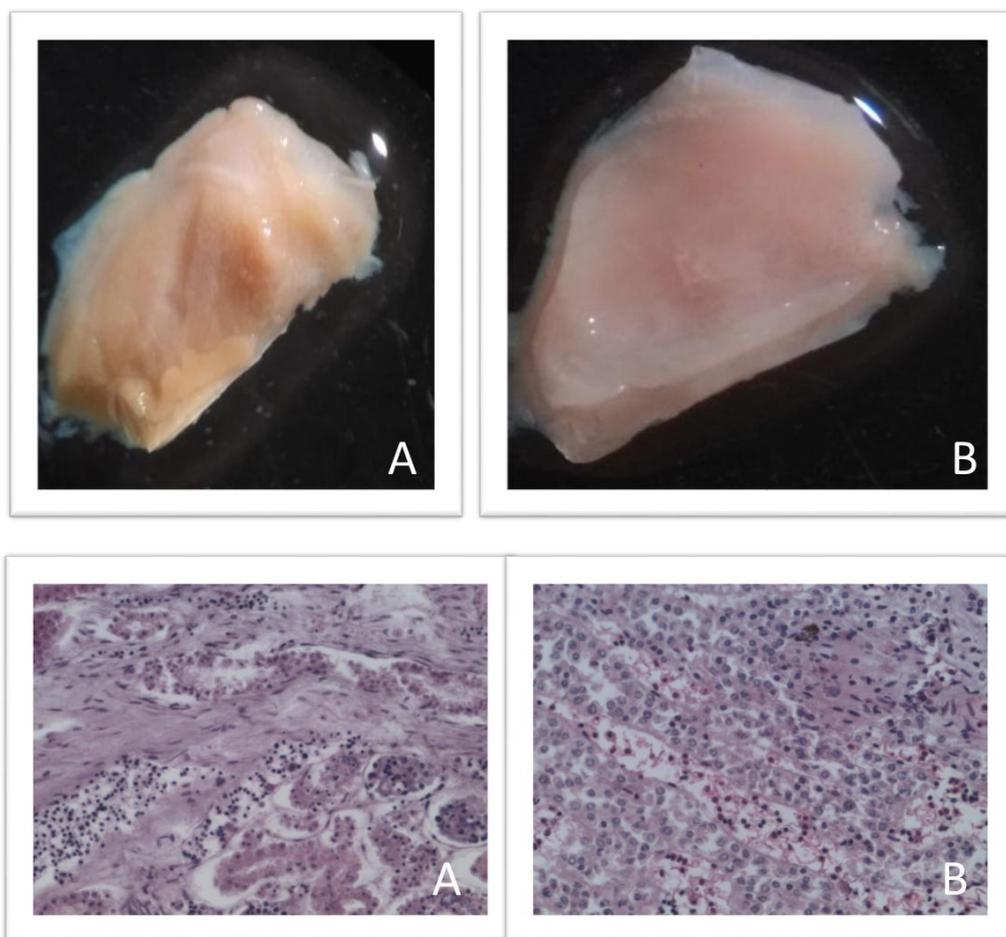


Figura 5. Morfologia externa e análise histológica das gônada das duas espécies e de ambos os sexos. **A-** Fêmea de *C.caretta*, com a borda da gônada em formato irregular e histologia mostrando o córtex bem desenvolvido e a medula desorganizada; **B-** Macho de *E.imbricata*, com a gônada lisa e em formato alongado, e histologia com a medula bem desenvolvida e os túbulos seminíferos.

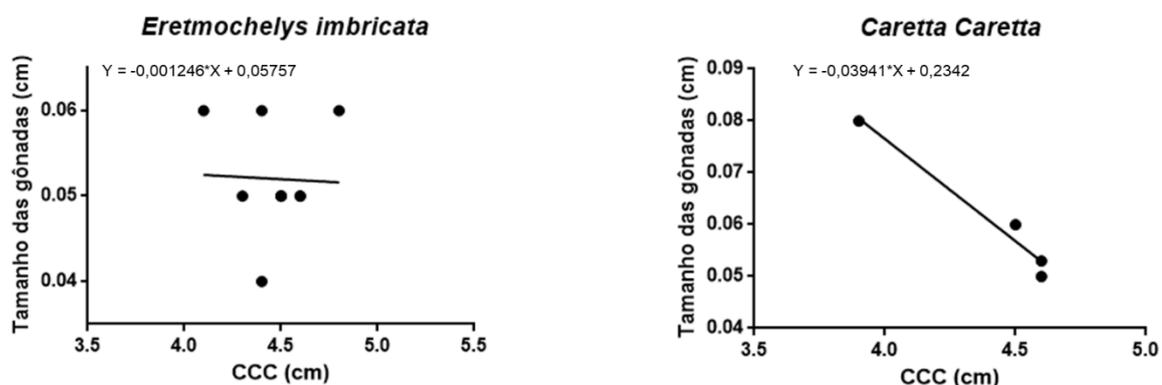


Figura 6. Correlação entre o Comprimento Curvilíneo da Carapaça (CCC) e o Tamanho das gônadas de *Eretmochelys imbricata* ($p=0,9187$; $r^2= 0,0013$) e *Caretta caretta* ($p=0,0172$; $r^2= 0,9659$).

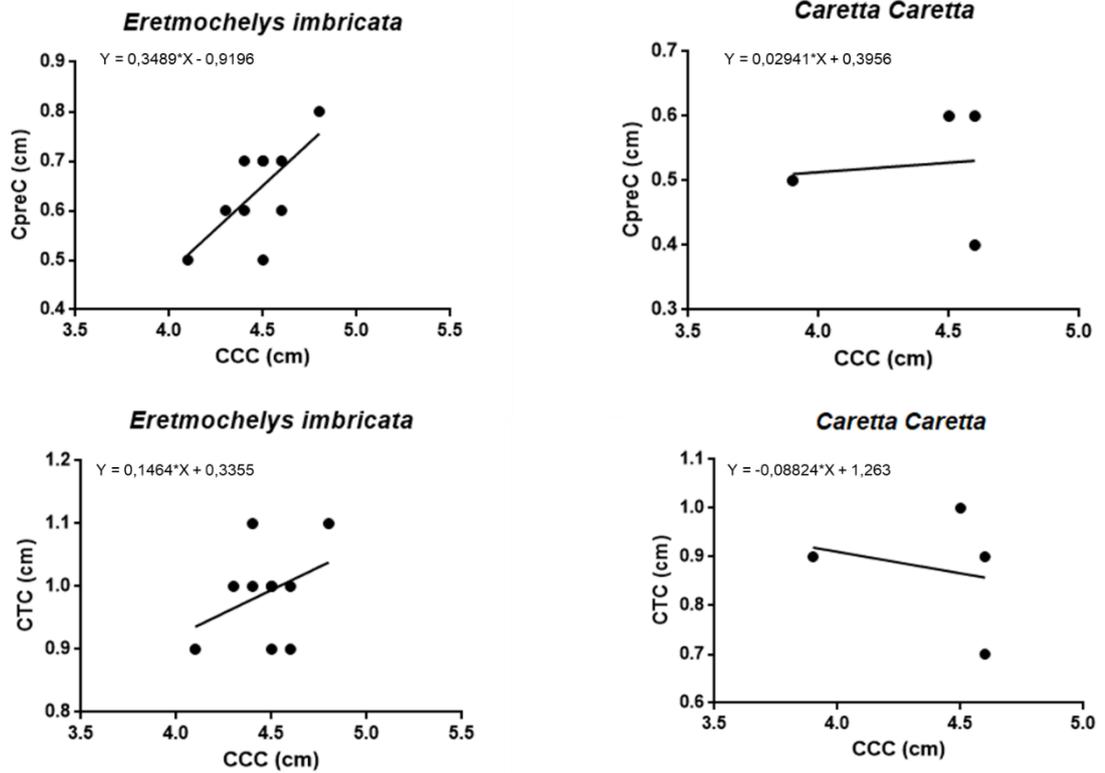


Figura 7. Correlação entre o Comprimento Curvilíneo da Carapaça (CCC) e a distância pré-cloacal (CpreC) (*E.imbricata*, $p=0,0298$; $r^2=0,4652$; *Caretta caretta*, $p=0,8966$; $r^2=0,0107$), e do Comprimento Curvilíneo da Carapaça (CCC) com o Comprimento Total da cauda (CTC) (*E.imbricata*, $p=0,2860$; $r^2=0,1404$; *Caretta caretta*, $p=0,7639$; $r^2=0,0557$).

REFERÊNCIAS

- [1] Godfrey, M.H., A.F. D'Amato, M.A. Marcovaldi, N. Mrosovsky. 1999. Pivotal temperature and predicted sex ratios for hatchling hawksbill turtles from Brazil. *Canadian Journal Zoology* 77: 1465–1473.
- [2] Wibbels, T. 2003. Critical approaches to sex determination in sea turtles. In: Lutz, P.L.; Musick, J.A. & Wyneken, J. (Eds.). *Biology of Sea Turtles*. Boca Raton, CRC Press 2: 103-134.
- [3] Mrosovsky, N., C. Pieau. 1991. Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphibia-Reptilia* 12: 169-179.
- [4] Lutz, P.L. 1997. Salt, water, and pH balance in the sea turtles. In: Lutz PL, Musick JA, Wyneken J. *The Biology of Sea Turtles*. Volume II. Florida, USA: CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A 343-361.
- [5] Marcovaldi, M.A, M.H. Godfrey, N. Mrosovsky. 1997. Estimating sex ratios of loggerhead turtles in Brazil from pivotal incubation durations. *Canadian Journal Zoology* 75: 755-770.
- [6] Mrosovsky, N., M. Godfrey. 1995. Manipulating sex ratios: turtle speed ahead!. *Chelonian Conservation Biology* 1: 238–240.
- [7] Ceriani, S.A., J. Wyneken. 2008. Comparative morphology and sex identification of the reproductive system in formalin-preserved turtle specimens. *Zoology* 111: 179-187.
- [8] Bull, JJ. (1980). Sex determination in reptiles. *Quarter. Rev. Biol.* 55, 3-21.
- [9] Wibbels, T. 2000. Determinación del sexo de Tortugas marinas en hábitats de alimentación. In Eckert, K.L., K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois, y M. Donnelly, (eds.) *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. Grupo de Especialistas En tortugas Marinas UICN/CSE Publicación 4: 160-164.
- [10] Owens, DW, J.R. Hendrickson, V. Lance, I.P. Callard. 1978. A technique for determining sex of immature *Chelonia mydas* using radioimmunoassay. *Herpetologica* 34: 270-273.
- [11] Mrosovsky, N., M. Benabib. 1990. An assessment of two methods of sexing sex hatchling sea turtles. *Copeia* 2: 589–591.

- [12] Wibbels, T. (2000). Determinación del sexo de tortugas marinas em hábitats de alimentación. In Eckert, KL., Bjorndal, KA., Abreu-Brobois, FA., and Donnelly, M. (eds.) Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas. Grupo de especialistas em tortugas marinas IUCN/CSE Publicacion. 4, 160-164.
- [13] Yntema, CL., Mrosovsky, N. (1980). Sexual differentiation in hatchling loggerhead (*Caretta caretta*) incubated at different controlled temperatures. *Herpetologica*. 36, 33-36.
- [14] LeBlanc, AM., Wibbels, T., Shaver, D., and Walker, JS. (2012). Temperature-dependent sex determination in the Kemp's Ridley sea turtle: effects of incubation temperatures on sex ratios. *Endang. Species Res.* 19, 123-128.
- [15] Wyneken, J., Epperly, SP., Crowder, LB., Vaughan, J., and Esper, KB. (2007). Determining sex in posthatchling loggerhead sea turtles using multiple gonadal accessory duct characteristics. *Herpet.* 63, 19-30.
- [16] Moura, CCM., Guimarães, ES., Amaral, GJA., and Silva, AC. (2012). Distribuição espaço-temporal e sucesso reprodutivo de *Eretmochelys imbricata* nas praias do Ipojuca, Pernambuco, Brasil. *Iheringia, Sér. Zool.* 102, 254-260.
- [17] Simões, T.N., Da Silva, A.C., Dos Santos, E.M., Chagas, C.A. 2014. Temperatura de incubação e razão sexual em filhotes recém-eclodidos da tartaruga marinha *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) no município do Ipojuca, Pernambuco, Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia* 54: 363-374.
- [18] Duarte, DLV., Monteiro, DS., Jardim, RD., Soares, JCM., and Varela, Jr. AS. (2011). Determinação Sexual e maturação gonadal de fêmeas da tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) e tartaruga-cabeçuda (*Caretta caretta*) no extremo sul do Brasil. *Acta Biol. Paran.* 40, 87-103.
- [19] Sönmez, B., Turan, C., Özdilek, SY., Turan, F. (2016). Sex determination of green sea turtle (*Chelonia mydas*) hatchlings on the bases of morphological characters. *J. Black Sea.* 22, 93-102.
- [20] Packard, GC., Packard, MJ. (1988) The physiological ecology of reptilian eggs and embryos. In: *Biology of the Reptilia* Vo. 16, (eds., Gans, C., Huey, R. B.), Alan R. Liss. New York, 524-605.
- [21] Bjorndal, KA., Bolten, AB., Chaloupka, MY. (2000) Green turtle somatic growth model: evidence for density dependence. *Ecol. Applic.* 10, 269-282.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Peixes e répteis apresentam a determinação sexual dependente da temperatura. A termossensibilidade durante a diferenciação sexual influencia o sexo nestes animais. Alguns autores sugerem que estas espécies que apresentam o sexo dependente da temperatura podem ser consideradas indicadores confiáveis em relação ao impacto biológico causado por ações antrópicas e pelo aquecimento global [42]. Estas espécies já estão apresentando mudanças na proporção sexual de suas populações, induzidas principalmente por altas temperaturas [10].

Como apresentado nesta dissertação, o tempo em que irá ocorrer a diferenciação sexual pode depender também de outros fatores, como crescimento corporal dos animais, o qual depende de fatores ambientais como umidade, trocas gasosas, densidade de animais por aquário no caso do *zebrafish*, bem como condições de alimentação e temperatura da água e do ambiente que altera a proporção sexual nos ninhos [8].

A padronização de novas técnicas foi e está sendo testada para auxiliar na identificação do sexo de animais em diferentes fases da vida, no caso de tartarugas marinhas, e também auxiliar para melhores condições de manutenção do *zebrafish* em biotérios. Avaliar aspectos de diferenciação em animais que apresentam a TSD é de grande importância para o *zebrafish*, sendo ele um modelo animal muito utilizado e com mecanismos ainda pouco entendidos.

Adicionalmente, tentamos caracterizar os mecanismos moleculares da determinação e da diferenciação sexual para complementar e entender como estes processos ocorrem em diferentes fases do desenvolvimento. Em tartarugas marinhas, considerando a dificuldade de se conseguir amostras de animais que apresentam um ciclo de vida complexo de acompanhar, são fundamentais métodos que auxiliem na identificação e conservação destas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hodgkin, J. (1992). Genetic sex determination mechanisms and evolution. *Bioessays* 14, 253-61.
- [2] Schartl, M. (2004). Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 634-41.
- [3] Haag, ES., and Doty, AV. (2005). Sex determination across evolution: connecting the dots. *PLoS Biol* 3, e21.
- [4] Xingang, W. (2007). Analysis of Gonad differentiation in Zebrafish histology and transgenics [tese]. China: Ocean University of Qingdao.
- [5] Ross, AJ., and Capel, B. (2005). Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends Endocrinol Metab* 16, 19-25.
- [6] Brennan, J., and Capel, B. (2004). One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* 5, 509-21.
- [7] Park, SY., and Jameson, JL. (2005). Minireview: transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology* 146, 1035-42.
- [8] Trukhina, AV., Lukina, NA., Wackerow-Kouzova, ND., and Smirnov, AF. (2013). The variety of vertebrate mechanisms of sex determination. *BioMed Reser. Intern.*
- [9] Siegfried, KR. (2010). In search of determinants: gene expression during gonadal sex differentiation. *J. of Fish Biol.* 76, 1879-1902.
- [10] Bachtrog, D., Mank, JE., Peichel, CL., Kirkpatrick, M., Otto, SP., Ashman T., Hahn, MW., Kitano, J., Mayrose, I., Ming, R., Perrin, N., Ross, L., Venzuela, N., and Vamori, JC. (2014). Sex determination: why so many ways of doing it?. *Plos One.* 12.
- [11] Budd, A., Banh, Q., Domingos, J., Jerry, D. (2015). Sex control in fish: approaches, challenges and opportunities for aquaculture. *J. Mar. Sci. Eng.* 3, 329.
- [12] Escobedo-Galvan, AH. (2013). Temperature-dependent sex determination in an uncertain world: advances and perspectives. *Rev. Mex. De Biodiver.* 84, 727-730.
- [13] Yamamoto, T. (1969). Sex differentiation. In "Fish Physiology" (D. J. R. W.S. Hoar, Ed.), Academic Press, New York. 117–175.

- [14] Chiang, EF., Pai, CI., Wyatt, M., Yan, YL., Postlethwait, J., and Chung, B. (2001a). Two *sox9* genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev Biol* 231, 149-63.
- [15] Chiang, EF., Yan, YL., Guiguen, Y., Postlethwait, J., and Chung, B. (2001b). Two *Cyp19* (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. *Mol. Biol. Evol.* 18, 542-50.
- [16] Maack G., and Segner, H. (2003). Morphological development of the gonads in zebrafish. *Jour. of Fish Biol.* 62, 895-906.
- [17] Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., and Iguchi, T. (2002). Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *Jour. Exper. Biol.* 205, 711-8.
- [18] Gilbert, P. and Miles, JNV. (2000). Evolution, Genes, Development and Psychopathology. *Clin. Psychol. Psychother.* 7, 246–255.
- [19] Norris, DO., and Carr, JA. (2005). *Endocrine Disruption: Biological Bases for Health Effects in Wildlife and Humans*, Oxford University Press, New York, NY, USA
- [20] Bull, JJ. (1980). Sex determination in reptiles. *Quarter. Rev. Biol.* 55, 3-21.
- [21] Pieau, C. (1996). Temperature variation and sex determination in reptiles. *Bioessays.* 18, 19–26
- [22] Wibbels, T. (2003). Critical approaches to sex determination in sea turtles. In: Lutz, PL., Musick, JA., and Wyneken, J. *The Biology of Sea Turtles. Volume II.* Florida, USA: CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A, 103–134.
- [23] Yntema, CL., Mrosovsky, N. (1980). Sexual differentiation in hatchling loggerhead (*Caretta caretta*) incubated at different controlled temperatures. *Herpetologica.* 36, 33–36.
- [24] Mrosovsky, N., and Pieau, C. (1991). Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphibia-Reptilia*, 12, 169-179.
- [25] Lutz, PL. (1997). Salt, water, and pH balance in the sea turtles. In: Lutz PL, Musick JA, Wyneken J. *The Biology of Sea Turtles. Volume II.* Florida, USA: CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A, 343-361.

- [26] Marcovaldi, MA., Godfrey, MH., and Mrosovsky, N. (1997). Estimating sex ratios of loggerhead turtles in Brazil from pivotal incubation durations. *Canad. Jour. Zool.* 75, 755-770.
- [27] Santos, D., Luzio, A. and Coimbra, AM. (2017). Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors. *Aquat. Tox.*, 191, 141-163.
- [28] von Hofsten, J. & Olsson, P. E. (2005). Zebrafish sex determination and differentiation: involvement of FTZ-F1 genes. *Reprod. Biol. and Endocr.* 3, 63.
- [29] Jørgensen, A., Morthorst, JE., Andersen, O., Rasmussen, LJ., and Bjerregaard, P. (2008). Expression profiles for six zebrafish genes during gonadal sex differentiation. *Reproduc. Biol. And Endocr.* 1-12.
- [30] Liew, WC., and Orbán, L. (2013). Zebrafish sex: a complicated affair. *Brief. In Funct. Genom.* 13, 172-187.
- [31] Webster, KA., Schach U., Ordaz, A., Steinfeld, JS., Draper, BW., and Siegfried, KR. (2016). *Dmrt1* is necessary for male sexual development in zebrafish. *Develop. Biol.*
- [32] Yin, Y., Tang, H., Liu, Y., Chen, Y., Li, G., Liu X., and Lin H. (2017). Targeted disruption of aromatase reveals dual functions of *cyp19a1a* during sex differentiation in zebrafish. *Endocrinol.* 1-4.
- [33] Cheshenko, K., Brion, F., Le Page, Y., Hinfrey, N., Pakdel, F., Kah, O., Segner, H., Rik, IL., and Eggen, RIL. (2007). Expression of zebrafish aromatase *cyp19a* and *cyp19b* genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol. Sci.* 96, 255–267.
- [34] Trant, J., Gavasso, S., Ackers, J., Chung, BC., and Place, AR. (2001). Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (*cyp19a* and *cyp19b*) in zebrafish fry (*Danio rerio*)
- [35] Devlin, RH., and Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191–364.
- [36] Ospina-Álvarez, N., and Piferrer, F., (2008). Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PLoS One* 3, e2837.
- [37] Reis, A. (2016). Plasma Steroid Hormones in Loggerhead and Green Sea Turtle Hatchlings [tese]. USA: Florida Atlantic University, Boca Raton.

- [38] Shoemaker, C., Ramsey, M., Queen, J., and D. Crews. (2007). Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1, in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. *Develop. Dynam.* 236, 1055-1063.
- [39] Sifuentes-Romero, I., Merchant-Larios, H., Milton, S. L., Moreno-Mendoza, N., DiazHernandez, V., and Garcia-Gasca, A. (2013). RNAi-mediated gene silencing in a gonad organ culture to study sex determination mechanisms in sea turtle. *Genes.* 4, 293-305.
- [40] Maldonado, LCT., Piedra, AL., Moreno-Mendoza, N., Valencia, AM., Martínez, AM., and Larios, HM. (2002) Expression profiles of Dax1, Dmrt1 and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gener. And Compar. Endocrin.* 129, 20-26.
- [41] Ramsey, M. and D. Crews. (2009). Steroid signaling and temperature-dependent sex determination-reviewing the evidence for early action of estrogen during ovarian determination in turtles. *Seminar in Cell & Developmental Biology.* 20, 283-292.
- [42] Hawkes, LA., McGowan, A., Godley, BJ., Gore, S., Lange, A., Tyler, CR., Wheatley, D., White, J., Witt, MJ., and Broderick, AC. (2013). Estimating sex ratio in Caribbean hawksbill turtles: testosterone levels and climate effects. *Aquat. Biol.* 18, 9-19.
- [43] Hau, M. (2007). Regulation of male traits by testosterone: implications for the evolution of vertebrate life histories. *Bioess.* 29,133–144.
- [44] Owens, DW. (1997). Hormones in the life history of sea turtles. In: Lutz PL, Musick JA (eds) *The biology of sea turtles*. CRC Press, Boca Raton, FL.315–341.
- [45] Smelker, K., Smith, L., Arendt, M., Schwenter J., Rostal, D., Selcer, K., and Valverde, R. (2014). Plasma vitellogenin in free-ranging loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) of the northwest atlantic ocean. *Journ. of Mar. Biol.* 1-10.
- [46] Licht, P., Rainey, W., and Clifton, K. (1980). Serum gonadotropin and steroids associated with breeding activities in the green sea turtle, *Chelonia mydas*. II. Mating and nesting in natural populations. *Gener. Comp. Endoc.* 40(1),116–122.
- [47] Al-Habsi, AA., AlKindi, AYA., Mahmoud, IY., Owens, DW., Khan, T, .and al-Abri, A. (2006). Plasma hormone levels in the green turtles *Chelonia mydas* during peak period of nesting at Ras AlHadd-Oman,” *Jour. of Endoc.*191,9–14
- [48] Ho, SM., Kleis, S., McPherson, R., Heisermann, GJ., and Callard, IP. (1982). Regulation of vitellogenesis in reptiles, *Herpet.*38, 40–50.

- [49] Ho, SM. (1991). "Vitellogenesis" in Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications, P. T. Pang and M. P. Schreibman, Eds., vol.4 of Reproduction, pp.91–126, Academic Press, San Diego, Calif, USA.
- [50] Westerfield, M. (2007). The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 5° ed. University of Oregon Press: Eugene, OR.
- [51] CONCEA – Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA. (2013). Disponível em: <file:///C:/Users/D%C3%A9bora/Downloads/DIRETRIZES%20DA%20PR%C3%81TICA%20DE%20EUTAN%C3%81SIA%20DO%20CONCEA.pdf> Acesso em: 02 de maio de 2018.
- [52] Lei Arouca. 2008. Lei nº 11.794. (Oct. 08. 2008). Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm> Acesso em: 02 de junho de 2018.
- [53] IACUC, Institutional Animal Care and Use Committee. Guidelines for euthanasia of zebrafish, (2013). Disponível em: < <http://www.iacuc.ucsf.edu>>. Acesso em: 02 de junho de 2018.
- [54] Pritchard, P., and Mortimer, JA. (2000) Taxonomía, Morfología Externa e Identificación de las Especies. En Eckert KL, KA Bjorndal, FA Abreu-Grobois & M Donnelly (Editores) Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. UICN/CSE Grupo Especialista en Tortugas Marinas Publicación No. 4 (Traducción al español).
- [55] Duarte, DLV., Monteiro, DS., Jardim, RD., Soares, JCM., and Varela, Jr. AS. (2011). Determinação Sexual e maturação gonadal de fêmeas da tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) e tartaruga-cabeçuda (*Caretta caretta*) no extremo sul do Brasil. Acta Biol. Paran. 40, 87-103.
- [56] Owens, DW., and Ruiz GJ. (1980). New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. Herpetol., 36,17-20.
- [57] Suazo, DP. (2016). Modelos matemáticos para la estimación de la razón de sexos em la tortuga prieta *Chelonia mydas*, en la reserva de la biosfera de los Ángeles, Baja California [tese]. Ensenada, México: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.

ANEXOS

Algumas das análises propostas ainda estão em andamento devido à problemas técnicos do biotério institucional e atraso na entrega de reagentes importados por fornecedores. Embora não seja exigência do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade (PPGEEB-PUCRS), a dissertação já está com os resultados organizados no formato de artigos, que serão concluídos e traduzidos para submissão ainda no primeiro semestre de 2019.

Artigo em andamento: Padronização de técnicas atuais para identificação sexual de tartarugas marinhas (*Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*) através de análises dos hormônios sexuais e genes por qRT-PCR”

Amanda Bungi Zaluski^{1,2}, Hugo Leonardo Rossiter Peixoto dos Santos³, Camila Miguel^{1,2}, Gustavo Martinez Souza⁴, Paulo Patta¹, Arley Cândido da Silva³, Monica R.R.M. Vianna^{1,2}

¹ Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil. e-mail: amanda.zaluski@acad.pucrs.br

² Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6681, 90619-900, Porto Alegre – RS, Brasil.

³ ONG Ecoassociados. Rua Caraúna, S/N, Praça 4, Porto de Galinhas – PE, Brasil.

⁴ ONG Caminho Marinho. Rio Grande – RS, Brasil.

RESUMO

As tartarugas marinhas possuem um mecanismo de determinação sexual dependente da temperatura (TSD). A diferenciação das gônadas ocorre durante o período de incubação dos ovos e durante este período, a temperatura atua juntamente com enzimas específicas sobre os processos de determinação e diferenciação sexual dos filhotes. Como as tartarugas juvenis não apresentam características sexuais externas, a laparoscopia é uma técnica invasiva e pouco utilizada. Assim, este trabalho objetivou padronizar técnicas a fim de, determinar o sexo de indivíduos vivos em diferentes estágios do desenvolvimento de duas espécies (*Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*) a partir dos níveis de hormônios sexuais (andrógenos e estrógenos) presentes

no sangue através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), bem como, os parâmetros moleculares a partir de genes alvo envolvidos nos mecanismos de determinação e diferenciação sexual por qRT-PCR. As coletas foram realizadas em diferentes áreas ao longo da costa brasileira, abrangendo áreas de alimentação e reprodução das duas espécies em questão. Foram coletados aproximadamente 2 mL de sangue, através da punção venosa no ceio servical com uma seringa heparinizada. Cada amostra foi identificada e armazenada em microtubos estéreis com heparina, em gelo, e posteriormente foram centrifugadas e o plasma, o soro e o sangue total separados em alíquotas e congelados em freezer -80°C até o dia das análises. Para o qRT-PCR a padronização necessária e o desenho de alguns primers ainda não existentes na literatura estão sendo realizados. A padronização dos kits de ELISA humanos já foram realizadas e demonstraram funcionalidade de forma efetiva. Análises finais estão sendo realizadas e os resultados obtidos serão adicionados antes da submissão para publicação em periódicos indexados.

Palavras-chave: biologia do desenvolvimento; hormônios sexuais; tartaruga-cabeçuda; tartaruga-de-pente; ELISA.

INTRODUÇÃO

As tartarugas marinhas possuem um mecanismo de determinação sexual dependente da temperatura (TSD) [1]. A diferenciação das gônadas ocorre durante o período de incubação dos ovos, especificamente durante o período termossensitivo, entre o vigésimo e quadragésimo dia de incubação [2]. Durante este período, a temperatura atua juntamente com enzimas específicas sobre os processos de determinação e diferenciação sexual dos filhotes [3]. Estes animais apresentam um ciclo de vida complexo, atingindo a maturidade sexual tardiamente, em média aos 25 anos e, a partir desse momento os indivíduos adultos podem apresentar dimorfismo sexual, o qual se caracteriza pelo maior comprimento da cauda e maior tamanho das unhas, nos machos. Antes desse período, esse dimorfismo não é visível, principalmente em filhotes e juvenis que ainda não atingiram a maturidade sexual [4,5].

Há ainda, uma temperatura determinante, chamada temperatura pivotal, que resulta em uma proporção de 1:1, ou seja, 50% de fêmeas para 50% de machos [6]. Sendo

assim, as tartarugas marinhas não apresentam cromossomos sexuais heteromórficos, mas sim genes específicos que estão envolvidos na determinação e diferenciação sexual [7].

Como as tartarugas juvenis não apresentam características sexuais externas, a laparoscopia é uma técnica útil, porém invasiva e cada vez menos utilizada [8]. Diversos estudos vêm demonstrando que os hormônios sexuais presentes no plasma podem ser usados isoladamente para estimar o sexo gonadal dos indivíduos [8].

O estudo das relações sexuais em todos os estágios de vida tem sido recentemente sugerido como uma prioridade para entender os efeitos ecológicos da mudança climática antropogênica sobre as tartarugas marinhas [9]. Além disso, nada se sabe ainda sobre a ontogênese da expressão absoluta e sazonal dos hormônios sexuais nestes animais, tornando complexa a comparação entre os diferentes estágios de vida [8].

Os hormônios, como a testosterona e o estradiol, são os hormônios sexuais mais conhecidos em animais adultos. De acordo com Hawkes *et al.*[8], estes hormônios também podem ter papéis adicionais em indivíduos juvenis, como crescimento e desenvolvimento ósseo e função imunológica, porém estes papéis adicionais ainda não são bem compreendidos.

Sabe-se que altas concentrações de estradiol no plasma podem resultar da atividade da enzima aromatase, que converte testosterona em estradiol, envolvida na produção de estrogênio bem como na diferenciação dos ovários [10,11]. A atividade da aromatase pode ser estimulada por altas temperaturas [8]. Além disso, machos podem aparecer como indivíduos intersexo como resultado da ação da aromatase (*cyp19a1*) mediada pela temperatura [8]. Juntamente com os hormônios sexuais, alguns genes que possuem ortólogos conhecidos já descritos em mamíferos, ocorrem de forma semelhante em tartarugas marinhas, como é o caso do *sox9* e *dmrt1* que estão envolvidos na diferenciação e desenvolvimento dos testículos [12,13,14,15,16].

Outro aspecto importante a ser avaliado em juvenis e adultos é a concentração circulante de vitelogenina. A vitelogenina ainda não foi completamente descrita em tartarugas marinhas reprodutivamente ativas e de vida livre e nem em fêmeas juvenis [17]. A vitelogênese é um processo em que as fêmeas de vertebrados ovíparos

sintetizam e utilizam para o desenvolvimento da gema do ovo [18]. De acordo com Smelker *et al.*[17], seria importante compreender de forma abrangente o ciclo sazonal vitelogênico, o que nos permitiria identificar o estado reprodutivo dos indivíduos, bem como a saúde reprodutiva destas fêmeas. Além disso, a concentração inicial de vitelogenina na reprodução dos fetos pode ser um indicador da qualidade e da quantidade de alimento disponível durante os períodos antes da nidificação [19], e também pode ser utilizada como um biomarcador do desenvolvimento reprodutivo em tartarugas juvenis [17].

Assim, este trabalho objetivou padronizar técnicas a fim de, determinar o sexo de indivíduos vivos em diferentes estágios do desenvolvimento de duas espécies (*Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*) a partir dos níveis de hormônios sexuais (andrógenos e estrógenos) presentes no sangue através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), bem como, os níveis de expressão de genes alvo potencialmente envolvidos nos mecanismos de determinação e diferenciação sexual por qRT-PCR.

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Área de Estudo e Licenças

As coletas foram realizadas em diferentes áreas ao longo da costa brasileira, abrangendo áreas de alimentação e reprodução das duas espécies em questão (Figura 1), em parceria com diferentes ONGs responsáveis pelo monitoramento das praias nas seguintes regiões.

Rio Grande (RS): respectiva área de alimentação de juvenis de *Caretta caretta*. As amostras foram coletadas entre os meses de outubro de 2017 a dezembro de 2018, em parceria com a ONG Caminho Marinho, a qual realiza o monitoramento e reabilitação de tartarugas nesta região.

Parque Nacional Marinho de Abrolhos (BA): área de alimentação de juvenis de *Eretmochelys imbricata* e área de reprodução de *Caretta caretta*.

Vitória (ES): respectiva área de reprodução de adultos de *Caretta caretta*. Nesta área, a parceria foi realizada com o Projeto Tamar.

Praia do Forte (BA): respectiva área de reprodução de adultos de *Caretta caretta* e ocasionalmente de *Eretmochelys imbricata*. Nesta área, a parceria foi realizada com o Projeto Tamar.

Porto de Galinhas (PE): respectiva área de reprodução de adultos de *Eretmochelys imbricata* e ocasionalmente de *Caretta caretta*, em parceria com a ONG Ecoassociados.

O presente trabalho foi aprovado pelo SISBio para coleta e transporte dos animais e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA-PUCRS, n° 8524) no qual foram realizadas as análises dos natimortos.

1.2 Coleta Sanguínea e Amostragem

Para a coleta de sangue cada animal contido teve o sangue coletado imediatamente após a contenção, a fim de evitar qualquer alteração nos níveis hormonais devido ao estresse causado [20,21]. Foram coletados aproximadamente 2 mL de sangue foram coletados, através da punção venosa no ceio servical [22] com uma seringa heparinizada. Cada amostra foi identificada e armazenada em microtubos estéreis com heparina, em gelo, e posteriormente foram centrifugadas e o plasma, o soro e o sangue total separados em alíquotas e congelados em freezer -80°C até o dia das análises.

Cada indivíduo, após a coleta sanguínea foi fotografado e medido com uma fita métrica quanto ao Comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) e a largura curvilínea da carapaça (LCC), principalmente. Quando possível foi analisado e medido o comprimento total da cauda (CTC), o comprimento pré-caudal (CpreC), o comprimento pós-caudal (CposC) e o tamanho do segundo par de unhas da nadadeira anterior, direita e esquerda (TU) [23] (Figura 2).

1.2.1 Juvenis e Adultos em áreas de alimentação

Os métodos de amostragem dos animais variaram em cada região, dependendo das condições do local e situações financeiras. Em Abrolhos – BA, os animais foram capturados por mergulho livre conforme Bolten e Bjorndal [24], por profissionais já habilitados nessa técnica. Após a captura as tartarugas foram levadas imediatamente até um barco de espera e, o animal foi contido manualmente (colocado em cima de uma caixa e segurado pela carapaça) para coleta de sangue e medições, e logo foi devolvido

ao mar. Já em Rio Grande – RS, o método utilizado é de captura intencional através de redes de emalhe, tecidas com nylon com 50 m de comprimento, 3,2 m de altura e 30 cm de malha entre nós, sendo o monitoramento desta rede feito a cada 1 hora para garantir que nenhum animal fique preso. Quando a tartaruga é encontrada, a mesma é levada até a beira da praia e as medidas e coletas são realizadas por profissionais, após o animal é liberado novamente ao mar.

1.2.2 Adultos em áreas reprodutivas

Em áreas de desova a metodologia utilizada é padrão e ocorre, no momento em que a fêmea inicia o processo de desova. Em Porto de Galinhas – PE e na Praia do Forte – BA, são realizadas “rondas noturnas” a procura de fêmeas subindo na praia para desovar ou a procura de rastros que elas deixam na areia. Quando uma fêmea é encontrada espera-se até o momento que ela inicia o processo de desova, pois é o momento que o animal entra em um estado de “transe” que possibilita sua manipulação sem comprometer a desova [25]. Para a coleta de sangue e medições, ambas foram realizadas no terço final da postura, como recomendado na própria autorização do SISBio concedida para este tipo de coleta.

1.2.3 Animais de cativeiro

Amostras de sangue de animais em cativeiro que já apresentam o sexo conhecido através de laparoscopia ou algum outro método, foram utilizadas como controle para melhor estabelecer níveis de referência para posterior identificação do sexo dos animais. Para a coleta os animais foram contidos manualmente fora da água e imediatamente foi coletado o sangue com uma seringa adequada ao tamanho de cada animal.

1.3 qRT-PCR

Para o qRT-PCR foram obtidas amostras de sangue total de indivíduos juvenis e adultos das duas espécies. O sangue foi acondicionado com 300 µl de Trizol (Invitrogen) e armazenado em *freezer* -80 °C. O RNAm será isolado conforme Nery *et al.* [26] e o cDNA sintetizado com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits. A pureza do RNA será quantificada usando nanodrop (ThermoScientific) e as amostras previamente testadas por eletrofose em gel de agarose 1,0% com corante de ácido nucleico (Biotium).

Esta etapa do projeto está em andamento, devido a padronização necessária e o desenho de alguns *primers* ainda não testados na literatura. Esta técnica será utilizada para avaliar a expressão gênica de genes específicos envolvidos na determinação e diferenciação sexual destes animais.

Para todos os genes, o qRT-PCR será realizado usando SYBR green qPCR supermix-UDG (Invitrogen). Para reações padrão serão utilizados um total de 25 µl, sendo: 12,5 µl do mix, 1 µl de primer (F+R), 10,5 µl de água e 1 µl de cDNA. A sequência de um dos primers para os genes constitutivos foi descrita previamente por Gómez-Picos *et al.* [27], e o segundo gene alvo está sendo desenhado através de uma ferramenta do Genbank, o PrimerBlast. Os primers para os genes alvo foram descritos previamente por Maldonado *et al.* [13] e Shoemaker *et al.* [14], e o gene para vitelogenina está sendo desenhado através da ferramenta PrimerBlast. As curvas de amplificação e dissociação geradas a partir de software serão usadas para análise da expressão do gene.

Os genes alvo avaliados serão o *Sox9*, *Dmrt1*, *Dax1*, *vtg* (vitelogenina) e *cyp19a* (aromatase), bem como os constitutivos *beta-actin* e *elfa* (*ef1-a*), conforme Tabela 1.

1.4 ELISA

Amostras de plasma e soro de animais juvenis e adultos foram coletadas e armazenadas individualmente em *freezer* -80°C. Esta etapa do projeto está em andamento, devido a padronização necessária da técnica. As análises hormonais estão sendo realizadas no Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso. Para cada uma das análises é feita duplicata de cada amostra.

Kits de ELISA para hormônios sexuais de humanos foram testados, uma vez que há grande conservação evolutiva entre os vertebrados e estão em processo de análise. Kits de testosterona plasmática (Cloud Clone, CEA458Ge), gonadotrofinas (FSH e LH) da Symbiosys (cod.10043 e cod.10044, respectivamente), progesterona (Symbiosys, cod.10095) e estradiol (Invitrogen, catalog n° KAQ0621) foram adquiridos e testados, conforme instruções do fabricante.

1.5 Análises Estatísticas

Para determinar a normalidade e a homogeneidade dos dados será usado o teste de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Para realizar a comparação entre os grupos será usado o teste Kruskal-Wallis para dados que não apresentem distribuição normal, utilizando Dunn como teste complementar, ou ANOVA para dados que apresentarem distribuição normal, usando Bonferroni como teste complementar quando $p > 0,05$ ou Games-Howell quando $p < 0,05$.

Já para a comparação entre dois grupos será utilizado o teste t de Student ou Mann-Whitney, sendo que as diferenças serão consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todas estas análises serão feitas no programa R Studio, versão 3.3.3, para Windows.

2. RESULTADOS PARCIAIS

Foram coletadas amostras de 22 juvenis de vida livre, 14 fêmeas adultas de vida livre, 1 macho adulto de vida livre e de cativo e 1 juvenil de cativo de *Eretochelys imbricata* (n=38). Da espécie *Caretta caretta* foram coletadas amostras de 5 juvenis de vida livre, 46 fêmeas adultas de vida livre e 1 macho de cativo de (n=52). As coletas foram realizadas durante os anos de 2017 a 2019 durante as temporadas reprodutiva e não reprodutiva.

A padronização dos kits de ELISA humanos já foi realizada e funcionou de forma efetiva. Análises finais estão sendo realizadas e os resultados obtidos serão adicionados antes da submissão deste manuscrito.

Agradecimentos

Às ONGs Ecoassociados, Caminho Marinho, Projeto Tamar e Parque Nacional Marinho de Abrolhos pelo apoio e auxílio nas coletas. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Número 830432/1999-0) com a concessão de bolsa de mestrado; Coordenação de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), e o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCTEN)/CNPq, com ajuda financeira para a realização do projeto.

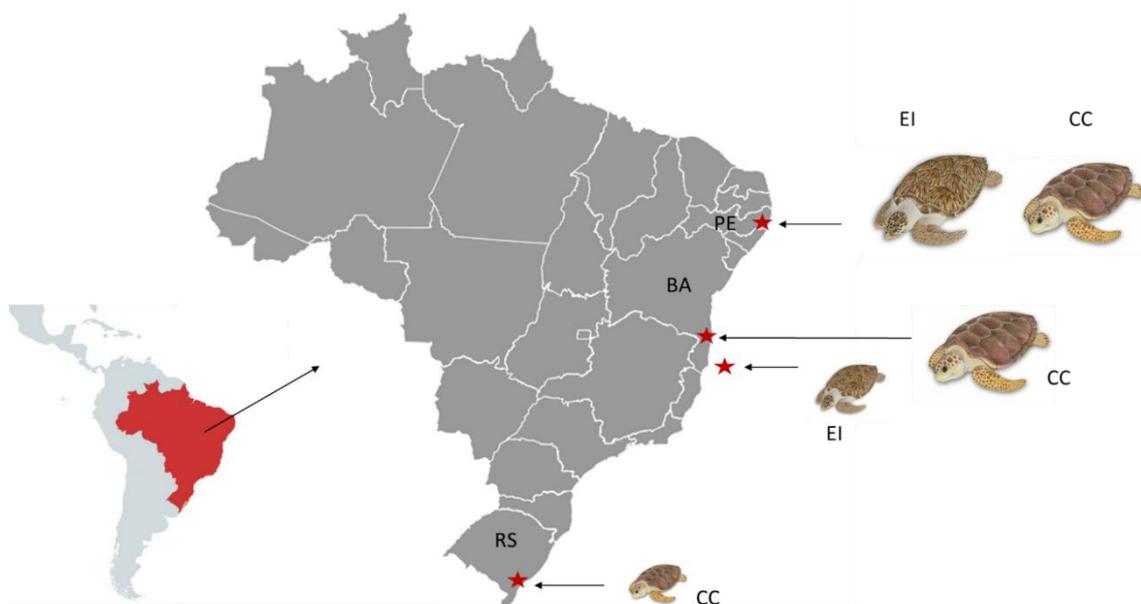


Figura 1. Respectivas localidades onde foram realizadas as coletas com as respectivas espécies representadas (CC= *Caretta caretta* e EI= *Eretmochelys imbricata*). RS – Rio Grande, juvenis de *Caretta caretta*; BA – Abrolhos, juvenis de *Eretmochelys imbricata* e adultos de *C. caretta*; BA – Praia do Forte, adultos de *C. caretta*; PE – Porto de Galinhas, adultos de *E. imbricata* e *C. caretta*.

Tabela 1. Sequência dos genes alvo e constitutivos utilizados para avaliar a expressão gênica através do qRT-PCR.

Gene	Sequência	Referência
<i>β-actina</i>	F: ACACAGGTGTGTAAGATGGCTTTGG	Gómez-Picos et al., 2014 [29]
	R: GAAGACTCAGGTCCAGGAAAGGAAA	
<i>Dmrt1</i>	F: CGCAGGTTGCATTGAGAAGGCAGC	Maldonado et al., 2002 [14]
	R: TCTGCCATTGGTTTCCTGATTGGC	
<i>Sox9a</i>	F: CCTGCCCTTCTGGTTCCG	Shoemaker et al., 2007 [15]
	R: TCCTCGTCCCTCTCTTTCTTCAG	
<i>Nr0b1 (Dax1)</i>	F: ACCAAGGAGTAC/TGCA/C/T/GTAC/TCT	Maldonado et al., 2002 [14]
	R: TCCAGA/C/T/GAGCATA/GTCA/GTCCAT	
<i>Cyp19a1</i>	F: TGGTCATGCGCAAGGCTTTA	Gómez-Picos et al., 2014 [29]
	R: GGCCAAATCCAAATGGCTGA	
<i>vtg</i>		Em processo
<i>elfa</i>		Em processo

REFERÊNCIAS

- [1] Godfrey M.H, D'Amato AF, Marcovaldi MA, Mrosovsky N. 1999. Pivotal temperature and predicted sex ratios for hatchling hawksbill turtles from Brazil. *Canadian Journal Zoology*, **77**: 1465–1473.
- [2] Wibbels T. 2003. Critical approaches to sex determination in sea turtles. In: Lutz PL, Musick JA, Wyneken J. *The Biology of Sea Turtles. Volume II*. Florida, USA: CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A, p 103–134.
- [3] Pieau, C. (1996). Temperature variation and sex determination in reptiles. *Bioessays*. 18, 19–26
- [4] Mrosovsky N, Godfrey MH. 1995. Manipulating sex ratios: turtle speed ahead! *Chelonian Conservation Biology*. 1: 238-240.
- [5] Ceriani, S.A., J. Wyneken. 2008. Comparative morphology and sex identification of the reproductive system in formalin-preserved turtle specimens. *Zoology* 111: 179-187.
- [6] Mrosovsky, N., and Pieau, C. (1991). Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphibia-Reptilia*, 12, 169-179
- [7]. Bull, JJ. (1980). Sex determination in reptiles. *Quarter. Rev. Biol.* 55, 3-21.
- [8] Hawkes, LA., McGowan, A., Godley, BJ., Gore, S., Lange, A., Tyler, CR., Wheatley, D., White, J., Witt, MJ., and Broderick, AC. (2013). Estimating sex ratio in Caribbean hawksbill turtles: testosterone levels and climate effects. *Aquat. Biol.* 18, 9-19.
- [9] Hamman, M., Godfrey, M. H., Seminoff, J. A., Arthur, K., Barata, P. C. R., et al. (2010). Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. *Endangered Species Research*, 11: 245-269.
- [10] Hau, M. (2007). Regulation of male traits by testosterone: implications for the evolution of vertebrate life histories. *Bioess.* 29,133–144.

- [11] Ramsey, M. and D. Crews. (2009). Steroid signaling and temperature-dependent sex determination-reviewing the evidence for early action of estrogen during ovarian determination in turtles. *Seminar in Cell & Developmental Biology*. 20, 283-292.
- [12] Moreno-Mendoza N, Harley VR, Merchant-Larios H. 2001. Temperature regulates SOX9 expression in cultured gonads of *Lepidochelys olivacea*, a species with temperature sex determination. *Developmental Biology*, 229: 319–326.
- [13] Maldonado, LCT., Piedra, AL., Moreno-Mendoza, N., Valencia, AM., Martínez, AM., and Larios, HM. (2002) Expression profiles of Dax1, Dmrt1 and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gener. And Compar. Endocrin.* 129, 20-26.
- [14] Shoemaker, C., Ramsey, M., Queen, J., and D. Crews. (2007). Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1, in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. *Develop. Dynam.* 236, 1055-1063.
- [15] Matsumoto Y e Crews D. 2012. Molecular mechanisms of temperature-dependent sex determination in the context of ecological developmental biology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 354: 103-110.
- [16] Reis A. 2016. Plasma Steroid Hormones in Loggerhead and Green Se Turtle Hatchlings [tese]. Boca Raton (FL): Florida Atlantic University.
- [17] Smelker K, Smith L, Arendt M, Schwenter J, Rostal D, Selcer K, et al. 2014. Plasma Vitellogenin in Free-Ranging Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*) of the Northwest Atlantic Ocean. *Journal*, p 1-10.
- [18] Gomes MGT, Santos MRD, Henry M. 2006. Tartarugas marinhas de ocorrência no Brasil: hábitos e aspectos da biologia da reprodução. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, 30 (1/2): 19-27.
- [19] Miller, J. D. (1997). Reproduction in sea turtles. pp. 51-81. In *The Biology of Sea Turtles Vol. II*, Lutz, P. K., Musick, J. A., and J. Wyneken (eds). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- [20] Goldberg DW. 2007. Determinação do perfil bioquímico de tartarugas marinhas de vida livre da espécie *Caretta caretta* (Linneaus, 1758) em nidação na baía de campos – RJ [dissertação]. Niteroi (RJ): Universidade Federal Fluminense.
- [21] Forattini JG. 2011. Concentrações de testosterona plasmática em uma população juvenil de *Chelonia mydas*, no efluente industrial de uma companhia siderúrgica – Vitória, Espírito Santo [dissertação]. Vila Velha (ES): Centro Universitário Vila Velha.

- [22] Owens DW, Ruiz GJ. 1980. New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. *Herpetologica*, 36 (1): 17-20.
- [23] Pritchard, P., and Mortimer, JA. (2000) Taxonomía, Morfología Externa e Identificación de las Especies. En Eckert KL, KA Bjorndal, FA Abreu-Grobois & M Donnelly (Editores) Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. UICN/CSE Grupo Especialista en Tortugas Marinas Publicación No. 4 (Traducción al español).
- [24] Bolten A, Bjorndal K. 1992. Blood profiles for a wild population of green turtles (*Chelonia mydas*) in the southern Bahamas: size-specific and sex-specific relationships. *Journal of Wildlife Diseases* 28 (3): 407–413.
- [25] Miller JD. 2017. Reproduction in sea turtles. In: *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, p. 65-96.
- [26] Nery, LR., Eltz, NS., Hackman, C., Fonseca, R., Altenhofen, S. and Guerra HN et al. (2014). Brain intraventricular injection of amyloid- β in zebrafish embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by lithium. *PLoS One*. 9.
- [27] Gomez-picos, P., Sifuentes-Romero, I., Merchant-Larios, H., Hernández-Cornejo, R., Díaz-Hernández-V. and García-Gasca, A. (2014). Expression of aromatase in the embryonic brain of the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*), and the effect of bisphenol-A in sexually differentiated embryos. *Int.J. Dev. Biol.* 58. 733-741.

ANEXO A – Aprovação CEUA-PUCRS para análises com *zebrafish*



SIPESQ Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 8134

Porto Alegre, 7 de agosto de 2017

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Validação de técnicas usando zebrafish (*Danio rerio*) como animal modelo para avaliar a determinação sexual dependente da temperatura" coordenado por MONICA RYFF MOREIRA ROCA

V I A N N A .
Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 07/08/2017 - 07/08/2019

Nº de Animais	Espécie
1344	Danio rerio
Total de Animais: 1344	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)

ANEXO B – Aprovação CEUA-PUCRS para análises com tartarugas marinhas



SIPESQ Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPEEQ: 8524

Porto Alegre, 16 de janeiro de 2019

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Padrões de determinação sexual de duas espécies de tartarugas marinhas (*Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*)" coordenado por MONICA RYFF MOREIRA VIANNA.

Sua investigação, respeitando com detalhes as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data, conforme recomendações abaixo:

Aprovado

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 16/01/2019 - 16/01/2020

Nº de Animais	Espécie
100	<i>Caretta caretta</i>
100	<i>Eretmochelys imbricata</i>
Total de Animais: 200	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)

ANEXO C – Autorização SISBIO para coleta e transporte de animais mortos



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 62014-1	Data da Emissão: 03/06/2018 22:35	Data para Revalidação*: 03/07/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Amanda Bungi Zaluski	CPF: 019.750.400-07
Título do Projeto: Determinação sexual de tartarugas marinhas através da histologia de gônadas	
Nome da Instituição : UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO E ASSISTÊNCIA	CNPJ: 88.630.413/0002-81

1	PE	ONG Ecoassociados	Fora de UC Federal
2	BA	PARQUE NACIONAL MARINHO DOS ABROLHOS	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Eretmochelys imbricata, Caretta caretta
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Caretta caretta, Eretmochelys imbricata

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Tartarugas marinhas)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão)
2	Método de captura/coleta (Tartarugas marinhas)	Outros métodos de captura/coleta(Coleta de natimortos e animais adultos mortos), Captura manual
3	Método de marcação (Tartarugas marinhas)	Foto-identificação

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO E ASSISTÊNCIA	

ANEXO D – Autorização SISBIO para coleta e transporte de sangue



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 60436-2	Data da Emissão: 23/11/2018 09:48:36	Data da Revalidação*: 23/11/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Camila Miguel	CPF: 834.761.130-00
Nome da Instituição: UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO E ASSISTÊNCIA	CNPJ: 88.630.413/0001-09

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Tartarugas marinhas)	Sangue
2	Método de captura/coleta (Tartarugas marinhas)	Captura manual, Outros métodos de captura/coleta(Mergulho livre)
3	Método de marcação (Tartarugas marinhas)	Anilha, Foto-identificação

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO E ASSISTÊNCIA	Outro



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br