DIEGO CARVALHO VIANA

Sazonalidade reprodutiva em machos de tartaruga (*Kinosternon scorpioides*) de vida livre no Nordeste brasileiro evidenciado por imunolocalização de enzimas esteroidogênicas no testículo e epidídimo

São Paulo
2016

DIEGO CARVALHO VIANA

**Sazonalidade reprodutiva em machos de tartaruga (*Kinosternon scorpioides*)
de vida livre no Nordeste brasileiro evidenciado por imunolocalização de
enzimas esteroidogênicas no testículo e epidídimo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto

De

acordo:

Orientador(a)

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3277
FMVZ

Viana, Diego Carvalho

Sazonalidade reprodutiva em machos de tartaruga (*Kinosternon scorpioides*) de vida livre no Nordeste brasileiro evidenciado por imunolocalização de enzimas esteroideogênicas no testículo e epidídimo / Diego Carvalho Viana. -- 2016.
59 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto.

1. Esteroidogênese. 2. Espermatogênese. 3. P450arom. 4. P450c17. 5. Jurará.
6. Tartaruga. I. Título.

BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Sazonalidade reprodutiva em machos de tartaruga de vida livre no Nordeste brasileiro evidenciado por imunolocalização de enzimas esteroidogênicas no testículo e no epidídimo", protocolado sob o nº 2588/2012, utilizando 38 (trinta e oito) tartarugas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio Chaves de Assis Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 14/3/2012.

We certify that the Research "Reproduction seasonality in the male turtles (*Kinosternon scorpioides*) of free-life in Northeast Brazil evidenced by immunolocalization of steroidogenic enzymes in the testis and epididymis", protocol number 2588/2012, utilizing 38 (thirty eight) turtles, under the responsibility Prof. Dr. Antonio Chaves de Assis Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/14/2012.

São Paulo, 2 de fevereiro de 2016.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: VIANA, Diego Carvalho

Título: Sazonalidade reprodutiva em machos de tartaruga (*Kinosternon scorpioides*) de vida livre no Nordeste brasileiro evidenciado por imunolocalização de enzimas esteroidogênicas no testículo e epidídimo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciência

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTO

Agradeço ao nosso Bom Deus, por toda a sabedoria e discernimento.

A minha família, por sempre acreditarem e me darem forças.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o desenvolvimento dessa jornada.

Ao prof. Antônio Chaves de Assis Neto pela orientação, aprendizagem e contribuição em meu desenvolvimento profissional, além de tudo pela consideração ao longo destes anos.

A todos os amigos conquistados nesse período, em especial ao parceiro Amilton Santos, pelo convívio, troca de experiências e se tornando um outro orientador.

A minha ex-companheira Juliana Queiroz da Silva, pela força de todos os dias, incentivo e tornar esse caminho menos árduo.

À secretária Jaquelina M. de Santana pela amizade conquistada, e ao técnico Edinaldo Ribas conhecido como “índio” pelos momentos de descontração e experiências aprendidas;

À Universidade de São Paulo (USP) e ao programa em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia pela oportunidade e anos de aprendizado.

Ao IBAMA por apoiar esta pesquisa.

RESUMO

VIANA, D. C. **Sazonalidade reprodutiva em machos de tartaruga (*Kinosternon scorpioides*) de vida livre no Nordeste brasileiro evidenciado por imunolocalização de enzimas esteroidogênicas no testículo e epidídimo.** [Reproductive seasonality in male turtles (*Kinosternon scorpioides*) of free life in Northeast Brazil evidenced by immunolocalization of steroidogenic enzymes in the testis and epididymis]. 2016. 59 f. Tese (Doutorado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

No Estado do Maranhão, na região da Baixada Maranhense, apresenta na fauna silvestre o réptil *Kinosternon scorpioides*, um quelônio de água doce popularmente conhecido como jurará e que possui valor social, econômico e ambiental para os ribeirinhos da cidade de São Bento. Este estudo contempla suas características biológicas reprodutivas baseadas em seu ambiente natural, com o intuito de permitir a preservação e o estabelecimento de planos de manejo reprodutivo e de uso sustentável da espécie. Recentemente poucos estudos em todo o mundo tratam sobre os aspectos do ciclo reprodutivo de tartarugas em face das características endócrinas, na América do Sul estudos desse tipo são recentes e escassos, sendo assim este é o primeiro estudo, que se tem conhecimento, que elucida um padrão sazonal reprodutivo da espécie *K. scorpioides*, associando hormônios gonadais com aspectos comportamentais. Trinta e oito animais adultos tiveram seus órgãos reprodutivos caracterizados para as enzimas esteroidogênicas P450 aromatase, P450c17 e PNADPH redutase através de imunomarcção e blotting, além de índice gonadossomático, morfometria e concentração de testosterona, corticosterona e estradiol pela técnica de radioimunoensaio. As mudanças biométricas, morfometria celular e a esteroidogênese testicular entre os períodos chuvoso e seco sugerem que o estrógeno produzido pelas células de leydig podem afetar a produção e a apoptose de células germinais durante o processo de espermatogênese, e a presença das enzimas P450aromatase e P450c17 em células de leydig acompanhados com a recrudescência testicular também reforça a ideia, de que elas podem desempenhar um papel na quiescência testicular. Esse trabalho evidenciou que as enzimas citocromo P450, citocromo P450c17 e NADPH-citocromo P450-redutase estão presentes no testículo e epidídimo nos diferentes períodos climáticos e podem estar relacionados à síntese de testosterona em tartarugas concordando com os diferentes achados para biometria e espermiogênese nos períodos chuvoso

e seco, o que, nos leva a sugerir um estado de quiescência durante o período seco e atividade espermatogênica no período chuvoso, semelhante ao que ocorre com as espécies que apresentam comportamento reprodutivo sazonal.

Palavras-chave: Esteroidogênese. Espermatogênese. P450arom. P450c17. Jurará. Tartaruga.

ABSTRACT

VIANA, D. C. **Reproductive seasonality in male turtles (*Kinosternon scorpioides*) of free life in Northeast Brazil evidenced by immunolocalization of steroidogenic enzymes in the testis and epididymis.** [Sazonalidade reprodutiva em machos de tartaruga (*Kinosternon scorpioides*) de vida livre no Nordeste brasileiro evidenciado por imunolocalização de enzimas esteroidogênicas no testículo e epidídimo]. 2016. 59 f. Tese (Doutorado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

In the state of Maranhão, in the lowland region, the reptile *Kinosternon scorpioides*, a freshwater chelonian, popularly known as swear has social, economic and environmental value to the riparian of the city of São Bento. This study includes reproductive biological characteristics based on their natural environment in order to enable the preservation and the establishment of reproductive management plans and sustainable use of the species. To date, few studies around the world address the aspects of the reproductive cycle of the turtles in the face of the endocrine features. In South America, these studies are recent and scarce. So this is the first study that elucidates a reproductive seasonal pattern of the species *K. scorpioides*, by associating gonadal hormones with behavioral aspects. Thirty-eight adult animals had their reproductive organs characterized for P450 steroidogenic enzyme aromatase, P450c17 and NADPH reductase by immunostaining and immunoblotting, and gonadosomatic index, morphology and concentration of testosterone, corticosterone and estradiol by radioimmunoassay. Biometric changes, cell morphology and testicular steroidogenesis between the rainy and dry seasons suggests that the estrogen produced by the leydig cells can affect the production and apoptosis of germ cells during spermatogenesis process; and the presence of P450aromatase and P450c17 enzymes in the leydig cells accompanied with testicular recrudescence also reinforces the idea that they may play a role in testicular quiescence. This work showed that the cytochrome P450 enzymes, P450c17 and NADPH-cytochrome P450 reductase are present in the testis and epididymis at different climatic periods and may be related to testosterone synthesis in turtles agreeing to the different findings for biometrics and spermiogenesis in and dry rainy periods. These findings suggest a state of quiescence during the dry

season and spermatogenic activity during the rainy season, similar to those found in species with seasonal reproductive behavior.

Keywords: Steroidogenesis. Spermatogenesis. Immunolocalization. P450arom. P450c17. Turtle.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Lista de anticorpo primários para imunohistoquímica e western blotting.....	28
Quadro 2 - Imunolocalização das enzimas citocromo P450aromatase, P450c17 e NADPH-redutase nos testículos e epidídimos de tartarugas K. scorioides com base no período chuvoso e seco.....	35
Quadro 3 - Contagem celular, razões celulares e produção espermática em Kinosternon scorioides (média $\pm$ D.P.)	39
Quadro 4 - P450 Aromatase no sistema reprodutor masculino adulto	44
Quadro 5 - Ciclos reprodutivos de tartarugas machos	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécime adulto de <i>Kinosternon scorpioides</i>	16
Figura 2 - Mapa do Estado do Maranhão, com destaque para a região da Baixada Maranhense, Município de São Bento.....	25
Figura 3 - Anatomia do aparelho genital masculino de tartaruga (<i>K. scorpioides</i>). : Vista topográfica (A) (Td e Te), epidídimo direito e esquerdo (Ed e Ee), ducto deferente (Dde), intestino grosso (Ig), pênis (P). B: Sintopia dos testículos, epidídimos e ductos deferentes. C: Testículo e epidídimos, época chuvosa (Janeiro-Junho). D: Testículo e epidídimo, época seca (Julho-Dezembro). Barra 2cm.....	32
Figura 4 - Média de precipitação mensal entre novembro de 2010 a outubro de 2014 correlacionada com acontecimentos importantes no ciclo gonadal	33
Figura 5 - Concentrações médias de estradiol, corticosterona e testosterona relacionados ao índice gonadossomático (IGS), diâmetro tubular e eventos do ciclo gonadal. [Mar (n=15); Jun (n=5); Set (n=5); Out (n=8); Dez (n=5)]. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p<0.05$).....	34
Figura 6 - Imunolocalização de citocromo P450arom, P450c17 e NADPH-redutase nos testículos de <i>K. scorpioides</i> no período chuvoso e seco. Controle negativo (G e H). A, E, F, G, H (Barra 20µm); B, C, D (Barra 50µm)	36
Figura 7 - Imunolocalização de citocromo P450arom, P450c17 e NADPH-redutase nos epidídimos de <i>K. scorpioides</i> no período chuvoso e seco. Controle negativo (G e H). A, B, C, E, F, G, H (Barra 20µm); D (Barra 50µm)	37
Figura 8 - Expressão das proteínas P450arom (A), P450c17 (B) e NADPH-redutase (C) nos testículos e epidídimos de tartaruga <i>K. scorpioides</i> . M(marcador – actina beta); Es (epidídimo – período seco); Ec (epidídimo – período chuvoso); Ts(testículo – período seco); Tc (testículo – período chuvoso).....	38
Figura 9 - Variáveis associadas com os níveis de testosterona através do teste de correlação de Pearson ($p<0,05$)	40

LISTA DE ABREVIATURAS

EDTA:	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FMVZ:	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GIMP:	GNU Image Manipulation Program
HCl:	Ácido clorídrico
IBAMA:	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio:	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
KDa:	Kilodalton
LabMet:	Laboratório de Meteorologia da UEMA
MA:	Maranhão
MMA:	Ministério do Meio Ambiente
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
OMM:	Normas da Organização Meteorológica Mundial
P450c17:	citocromo 17 α -hidroxilase/17,20 liase P450
PCD:	Plataforma de coleta de dados
PVDF:	Polivinilideno difluoreto
RIA:	técnica de radioimensaio
SDS:	Detergente dodecilo sulfato de sódio
SNK:	Student-Newman-Keuls
TBS:	Tampão Tris-salino
TRIS:	Tris (hidroximetil) aminometano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
3	REGULAÇÃO DOS EVENTOS REPRODUTIVOS NA ATIVIDADE GONADAL E OS EFEITOS SOBRE OS HORMÔNIOS REPRODUTIVOS EM MACHOS DE JURARÁ (<i>K. scorpoides</i>) DE VIDA LIVRE	23
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4	MATERIAL E MÉTODO	25
4.1	ÁREA DE ESTUDO	25
4.2	ANIMAIS E “DESIGN” EXPERIMENTAL	26
4.3	COLETAS DE TESTÍCULO, EPIDÍDIMO E AMOSTRA DE SANGUE	26
4.4	IMUNOHISTOQUÍMICA	28
4.5	WESTERN BLOTTING	29
4.6	CONTAGEM CELULAR	30
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5	RESULTADOS	32
5.1	DESCRIÇÃO ANATÔMICA DOS ÓRGÃOS GENITAIS MASCULINOS	32
5.2	MORFOFISIOLOGIA	33
5.3	IMUNOHISTOQUÍMICA	35
5.4	WESTERN BLOTTING	38
5.5	MORFOMETRIA DOS COMPONENTES TESTICULARES	39
6	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO GERAL

O fenômeno evolutivo de especiação que ocorre na família Cheloniidae é estudado por alguns pesquisadores em diferentes partes do mundo. Especificamente, as tartarugas, que são representantes desse grupo, apresentam simpatria devido ao grande número de subespécies. O entendimento de como essa variabilidade possibilita o sucesso biológico através de estratégias reprodutivas e conservação do fenótipo em diferentes ambientes ainda não é totalmente compreendido.

Investigações sobre o conhecimento biológico das espécies pertencentes à subordem Cryptodira, como o jurará, em ambientes naturais são fundamentais para assegurar sustentabilidade, preservação e estabelecimento de planos de manejo reprodutivo, já que espécies da subordem Amphichelydia estão todas extintas. A partir disso, sabe-se, pois, que o risco de vulnerabilidade é eminente (FORERO-MEDINA, 2007), visto que esses animais têm hábito sazonal e ainda não há mensuração específica sobre a taxa de desova (ALVAREZ DEL TORO, 1983; IVERSON, 2010).

Estudos com animais sazonais são realizados no intuito de entender a relação das enzimas esteroidogênicas, responsáveis pela produção de hormônios e funções reprodutivas (EISENHAUER et al., 1994; HEJMEJ et al., 2005; ARROYO, 2013), com mudanças na imunolocalização destas durante a fase reprodutiva.

Considerando as poucas informações acerca dos aspectos reprodutivos de jurará e por se tratar de uma espécie silvestre protegida pela Lei de crimes Ambientais (9605/2008), pesquisas vêm sendo realizadas no Criadouro Científico para *K. scorpioides* da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), autorizado pelo IBAMA – MA (1899339/2008), permitindo contribuir com informações para novos estudos morfofisiológicos e de preservação, respondendo a diversos interesse econômico, social e cultural, além disso favorece a compreensão do manejo reprodutivo e desenvolvimento de ações clínicas que promovam o aprimoramento do médico veterinário para espécies silvestres.

Com relação ao jurará, alguns estudos têm examinado a biologia reprodutiva incluindo alterações sazonais, morfológicas, do desenvolvimento em gônadas

(OLIVEIRA, 2009; CARVALHO, 2010; CHAVES, 2011) e dos esteróides (CHAVES, 2011), porém, todos foram realizados em tartarugas mantidas em cativeiro.

Com base nos dados obtidos por nosso grupo de pesquisa através de análises histológicas, biométricas e avaliações da concentração de testosterona referentes à influência do ambiente sobre a sazonalidade nessa espécie, a hipótese do estudo é de que as enzimas citocromo P450 Aromatase, NADPH-Citocromo P450 Redutase e Citocromo P450c17 (17- α -Hidroxilase/17, 20-liase) possuem diferentes locais de imunolocalização dentro do compartimento testicular e ao longo do processo espermatogênico e no epidídimo durante os períodos chuvoso e seco.

Poucos estudos, em todo o mundo, tratam sobre os aspectos do ciclo reprodutivo de tartarugas em face das características endócrinas. Na América do Sul estudos desse tipo são recentes e escassos, sendo assim, este é um estudo pioneiro, que visa elucidar um padrão sazonal reprodutivo do jurará, associando os hormônios gonadais e os aspectos comportamentais em vida livre.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O *K. scorpioides* é uma tartaruga de água doce pertencente à família Kinosternidae. Essa família inclui 25 espécies (IVERSON et al., 2013). Trata-se de um quelônio de hábito aquático e terrestre e de espécie onívora, pois se alimenta de peixes, girinos, anfíbios adultos, insetos, algas, restos vegetais, crustáceos e gastrópodes (VANZOLINI et al., 1980; ACUÑA-MESÉN et al., 1994; DELDUQUE, 2000).

Tem como característica casco alto com três quilhas nítidas, especialmente a mediana, a qual percorre toda carapaça no sentido longitudinal. A carapaça apresenta coloração castanha e o plastrão de cor amarelada diversamente manchada de castanho. A cabeça tem coloração cinza escuro, variavelmente salpicada de branco no topo; membros e cauda, igualmente, são cinza escuro (VANZOLINI et al., 1980). Essa espécie recebe denominações populares diferentes de acordo com o local onde é encontrada. No Estado do Maranhão chama-se “juraré”, enquanto no Estado do Pará, “muçã”. Em outras regiões é também conhecida como tartaruga da “lama” (Figura 1).

Figura 1 - Espécime adulto de *Kinosternon scorpioides*

Fonte: (VIANA, D. C., 2014)

A distribuição geográfica do *juraré* é ampla, tendo sido encontrado no Brasil, Peru, Equador, norte da Colômbia, Venezuela, nas três Guianas, Bolívia, Argentina e todos os países da América Central. Há ocorrência desde o nível do mar até 2.500m de altitude (ACUÑA-MESÉN, 1994; TURTLE TAXONOMY WORKING

GROUP, 2009). No Brasil, está presente nos Estados do Pará, Amazonas, Maranhão, norte de Goiás, Ceará, Mato Grosso, Rio Grande do Norte e Pernambuco (PRITCHARD; TREBBAU, 1984; IVERSON, 1992; CABRERA; COLANTONIO, 1997; BERRY; IVERSON, 2001; COSTA et al., 2010c). No Maranhão, é encontrado em campos e à beira de rios da Baixada Maranhense (VANZOLINI et al., 1980; PEREIRA, 2000), com sua presença endêmica na Cidade de São Bento (PEREIRA et al., 2007; SOUSA et al., 2013).

Quanto ao dimorfismo sexual, este se expressa principalmente na diferença da cauda e do plastrão. Em geral, as fêmeas possuem cauda curta e plastrão reto, enquanto nos machos, a cauda é longa e o plastrão é côncavo para facilitar a cópula no momento da monta sobre a fêmea. A cauda do macho, na parte final, possui uma estrutura semelhante a uma unha. Acreditava-se que naquela havia um ferrão usado para defesa, tal como no escorpião, daí a denominação de *scorpioides* como nome científico da espécie. Na verdade, a única função conhecida para essa estrutura é a de segurar a fêmea durante o acasalamento (DELDUQUE, 2000). Outras características frequentemente observadas são a cabeça bastante pigmentada, chegando a ser negra, unhas mais longas nos machos, e nas fêmeas, a cabeça é mais clara e as unhas mais curtas (CASTRO, 2006; PEREIRA et al., 2007).

Já sob o ponto de vista econômico, em algumas regiões brasileiras, os quelônios são os mais importantes répteis (SANTOS, 1994). A carne do jurará é preparada e acondicionada em seu próprio casco, constituindo a “casquinha de muçã” (DELDUQUE, 2000). Como alimento, esse prato é bastante apreciado em restaurantes e hotéis de alto padrão das regiões Norte e Nordeste do Brasil; traço de também costume local para as populações ribeirinhas do Município de São Bento-MA, servindo como importante fonte econômica (PEREIRA et al., 2007).

Sobre preservação e sustentabilidade, é sabido que por muitas décadas se destacou a potencialidade de recursos hídricos de forma a permitir um estuário favorável à presença de dita espécie. Apesar de ela ainda não ter sido declarada em extinção pelo IBAMA, seu futuro é ameaçado pelas queimadas, poluição, desmatamento e coleta indiscriminada tanto dos adultos quanto dos ovos, não havendo estimativas precisas sobre o estoque da espécie existentes na natureza. Sabe-se, contudo, que a população é vulnerável (PEREIRA et al., 2007). Além disso, muitos animais são capturados para ser comercializados como animais de

estimação (MOLINA, 1999), mas a coleta é proibida pelo IBAMA-MA, por tratar-se de uma espécie silvestre que tem proteção governamental assegurada pela lei Federal nº 9605/98 (Lei de Crimes Ambientais).

Neste contexto, o estudo dos parâmetros reprodutivos nos *K. scorpioides* recém-capturados são importantes para a análise histológica e de imunohistoquímica dos testículos no intuito de conhecer e interpretar a morfologia do testículo com o ciclo natural da espécie em diferentes fases do ano, de forma que estes resultados possam ser utilizados em estratégias sustentáveis de conservação e reprodução para evitar assim, a extinção da espécie e ao mesmo tempo garantir a reprodução in-situ e ex-situ, respaldada pela Instrução Normativa do IBAMA nº 169/2008, que versa sobre as diretrizes de criação para quelônios de água doce, incluindo-se o *K. scorpioides*, uma vez que esta espécie de quelônio é amplamente procurada como iguaria para consumo pela população ribeirinha no Estado do Maranhão.

O órgão reprodutor do *K. scorpioides* macho é composto por um par de testículos, de epidídimos, de ductos deferentes e um pênis. Os testículos têm o formato ovóide e tamanho variável com coloração entre o amarelo-claro ao amarelo-ouro estando fixados pelo mesórquio e o mesocólon à cavidade celomática. Os epidídimos são estruturas convolutas de coloração esbranquiçada, os quais não apresentam inserção direta aos testículos; os ductos deferentes são contínuos aos epidídimos (VIANA et al., 2013) e não formam nenhuma ampola distinta, inserindo-se na cloaca. O pênis é sulcado, composto por raiz, corpo e glândula, localizado no assoalho ventral da cloaca e fixado a ela através de um músculo retrator, protegido pelo prepúcio (CARVALHO et al., 2010).

A nutrição do sistema reprodutor de *K. scorpioides* é realizada através das artérias urogenitais que tem sua origem a partir da aorta dorsal. Essas artérias correspondem aos principais vasos de distribuição sanguínea, aos órgãos urinários e reprodutivos (OLIVEIRA et al., 2009). É fato conhecido que o ciclo reprodutivo nos diferentes animais está sob controle hormonal, o qual aciona diretamente as modificações fisiológicas do sistema reprodutor durante a estação reprodutiva (REDDY; PRASAD, 1970).

Nos machos, o principal hormônio gonadal responsável pela espermatogênese e diferenciação sexual é a testosterona. Além deste, dois outros

hormônios têm grande importância no controle reprodutivo, o folículo estimulante (FSH), responsável pelo crescimento testicular, e o luteinizante (LH), que estimula a secreção direta da testosterona pelas células de Leydig. A testosterona, além de influenciar no tamanho dos testículos em relação ao tamanho corporal, também é responsável pelas alterações sonoras, do comportamento da cópula e da defesa de território (HAFEZ, 2005).

A puberdade, nos machos de tartarugas *Caretta caretta*, começa quando os testículos passam a produzir altas concentrações de testosterona, resultando em vários efeitos como o estímulo ao desenvolvimento das características sexuais secundárias (alongamento da cauda e amolecimento do plastrão), maturação dos túbulos seminíferos e início da espermatogênese. Nesta fase, a testosterona estimula a atividade das células de Sertoli e a mitose de células germinais, as quais se diferenciam em espermatócitos primários e migram em direção ao lúmen dos túbulos seminíferos. Os espermatócitos primários iniciam o processo de meiose, dando origem aos espermatócitos secundários, que após a segunda divisão meiótica dão origem às espermátides (WIBBLES et al., 1991).

As enzimas citocromo P450 aromatase se expressam nas gônadas, cérebro e sistema nervoso de todos os vertebrados e até mesmo do protocordado anfioxo, regulando a produção de hormônios esteroides sexuais e funções reprodutivas (CONLEY et al., 2009). Entretanto, os passos enzimáticos que envolvem a esteroidogênese nas diferentes espécies, não estão completamente compreendidos, havendo variações no comportamento enzimático dentre as espécies de animais domésticos e silvestres. As enzimas citocromo P450, em mamíferos, são codificadas por 10 famílias de genes e seus nomes começam com CYP, do inglês cytochrome P450. Os seres humanos possuem mais de 100 genes que codificam as enzimas P450 com especificidades distintas (STRYER, 1996).

Nos mamíferos, os complexos enzimáticos citocromo P450 Aromatase e citocromo P450c17, associados à enzima redutora NADPH-citocromo P450 redutase são os responsáveis pela síntese do estrógeno a partir dos andrógenos e dos andrógenos, a partir da progesterona, respectivamente (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001; PRAPORSKI et al., 2009). Os estrógenos e andrógenos são importantes em ambos os sexos em vários aspectos do crescimento, no desenvolvimento e na

diferenciação morfológica, bem como no desenvolvimento e na regulação do comportamento e dos ciclos sexual e reprodutivo (YANG et al., 2010).

Nas tartarugas, a atividade da enzima aromatase foi descrito na espécie *Trachemys scripta*, onde a enzima P450aromatase foram imunolocalizadas em células de Sertoli e Leydig, as quais auxiliam o processo espermatogênico, além da crescente importância dos hormônios sexuais na regulação da fertilidade, os répteis representam o mais antigo vertebrado capaz de retenção de esperma no epidídimo e até mesmo no testículo (GIST et al., 2007). Nos anfíbios *Necturus maculosus*, as células testiculares de Leydig possuem atividade aromatase (CALLARD et al., 1980), mas em tubarão da espécie *Squalus acanthias* (CALLARD et al., 1985) e em galo (KWON et al., 1995), a atividade é restrita no desenvolvimento de células germinativas, que pode ser inteiramente ausente nos testículos de teleósteos *Oncorhynchus mykiss* (KOBAYASHI et al., 1998).

As mudanças sazonais na morfologia e espermatogênese dos testículos e as concentrações de testosterona têm sido relatadas em numerosas espécies de características sazonais, como ursos, cervídeos (KOMATSU et al., 1997; TSUBOTA et al., 1997; HAYAKAWA et al., 2010).

Por outro lado, enzimas citocromo P450c17 e citocromo P450 aromatase, também são utilizadas em tratamentos terapêuticos de cânceres de mama e próstata (PRAPORSKI et al., 2009). A expressão aberrante de citocromo P450 aromatase em tecidos inespecíficos, os quais geralmente não apresentam altas concentrações dessa enzima, normalmente está acompanhada de diversas condições patológicas. Estas condições patológicas incluem ginecomastia, precocidade sexual, tumores da mama, dos testículos, do fígado, do córtex adrenal, de úteros e também endometriose (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

Aspectos relacionados aos componentes da espermatogênese associados com a expressão de enzimas para metabolização de estrógeno em andrógenos, como a P450 aromatase e P450c17, parecem ter também um controle parácrino, pois os estrógenos sintetizados pelas células de Sertoli inibem a síntese de testosterona nas células de Leydig por inibir a enzima que cliva o colesterol, o citocromo P450scc (DE KRETZER; KERR, 1988).

Com base na escassez de dados sobre a biologia reprodutiva em vida livre e em cativeiros relativo a esta espécie, estudos do nosso grupo de pesquisa, sediado

na Universidade Estadual do Maranhão, vem se esforçando para compreender o comportamento reprodutivo da espécie e profunda o conhecimento de *K. scorpoides* em diferentes estações climáticas, tais como pesquisas relacionadas a descrição do plexo venoso (PEREIRA et al., 2011), desenvolvimento embriológico (ANUNCIAÇÃO et al., 2011, 2012), morfologia epididimária (VIANA et al., 2013) e morfologia do ducto deferente (VIANA et al., 2014c) e aspectos morfológicos da fêmea em cativeiro (CHAVES et al., 2012). Sousa et al. (2014) com base no desenvolvimento do acrossoma em espermátides e das associações globais de células germinativas revelaram dez estágios do ciclo do epitélio seminífero em *K. scorpoides*.

Tendo em vista essas informações justifica-se a necessidade de estudos dos parâmetros reprodutivos em jurarás recém-capturados para assegurar sua sustentabilidade, preservação e estabelecer planos de manejo reprodutivo e de uso racional da espécie.

ARTIGO

3 REGULAÇÃO DOS EVENTOS REPRODUTIVOS NA ATIVIDADE GONADAL E OS EFEITOS SOBRE OS HORMÔNIOS REPRODUTIVOS EM MACHOS DE JURARÁ (*K. scorpioides*) DE VIDA LIVRE

A tartaruga *K. scorpioides* (jurará) é um quelônio de água doce pertencente à família Kinosternidae. Atualmente, devido à preocupação com a conservação da espécie, pesquisadores têm se dedicado à investigação de aspectos reprodutivos desta, visando estratégias para o manejo desses animais na Baixada Ocidental Maranhense. O objetivo deste estudo foi imunolocalizar e quantificar as mudanças na expressão das enzimas esteroideogênicas citocromo: P450 aromatase, P450c17 e P450 NADPH-redutase nos testículos e epidídimos de *K. scorpioides* entre os períodos chuvoso e seco através de testes imunohistoquímicos e Western blotting. Os resultados evidenciaram que as enzimas citocromo P450aromatase, P450c17 e P450 NADPH-redutase estão diferentemente expressas durante esses dois períodos tanto no testículo quanto epidídimo e podem também estar relacionadas à síntese de andrógenos e estrógenos, concordando com os diferentes achados para biometria e espermiogênese nos períodos chuvoso e seco. Isso nos levou a sugerir um estado de quiescência testicular durante o período seco e atividade espermatogênica no período chuvoso, semelhante ao que ocorre com espécies as quais apresentam comportamento reprodutivo sazonal.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a imunolocalização das enzimas Citocromo P450 Aromatase, NADPH-citocromo P450-redutase e Citocromo P450c17 (17- α -Hidroxilase/17, 20-liase), no parênquima testicular e sua associação com o processo espermatogênico, e, no epidídimo de tartaruga de água doce *K. scorpioides* em duas estações reprodutivas definidas: períodos chuvoso e seco.

3.2 OBJETIVOS ESPEFICOS

- Imunolocalizar a expressão da enzima citocromo P450c17 (17-alfahidroxilase/17, 20-liase) no parênquima testicular e epidídimo nas estações seca e chuvosa, pelo método de imunohistoquímica;
- Caracterizar comparativamente as mudanças na expressão das enzimas citocromo P450 aromatase, citocromo, P450c17 (17-alfa-hidroxilase/17, 20-liase), NADPH-citocromo P450-redutase no epidídimo nos períodos chuvoso e seco;
- Correlacionar às variáveis biométricas, climáticas e hormonais com a sazonalidade reprodutiva.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O município de São Bento-MA está localizado na microrregião da Baixada Maranhense, a qual é composta por 21 municípios. São Bento localiza-se dentro da macrorregião norte do estado, apresentando as seguintes coordenadas geográficas: 2°41' S latitude, 44°49' W longitude (-2.683, -44.817) e possui uma área territorial de 459 km² com clima tropical úmido, de acordo com os dados do Laboratório de Meteorologia da UEMA – LabMet/2014 (Figura 2).

Figura 2 - Mapa do Estado do Maranhão, com destaque para a região da Baixada Maranhense, Município de São Bento

adaptado de Atlas..., 2002.

Para os dados climáticos, segundo Normas da Organização Meteorológica Mundial (OMM), dados obtidos por uma plataforma de coleta de dados (PCD) são representativos de uma área de até 100 km do posto de coleta. Pela falta de dados avaliados para os locais próximos à região pesquisada, foram considerados os

valores dos anos de 2010 a 2014 do posto de coleta de Alcântara, cidade distante 159 km de São Bento, Maranhão, Brasil.

4.2 ANIMAIS E “DESIGN” EXPERIMENTAL

Foram utilizados 38 animais adultos machos provenientes da captura na cidade de São Bento-MA. As coletas foram autorizadas pelo ICMBio/MMA para atividades com finalidade científica nº 33021-4 e aprovação da Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, de acordo com protocolo 2588/2012.

Esses animais foram selecionados a partir de 10 cm de carapaça e divididos em dois grupos experimentais dos quais um foi composto por 18 exemplares coletados na estação seca, mês de outubro, e 20 exemplares na estação chuvosa, mês de março. Os dados de peso dos testículos (direito e esquerdo) com a massa corporal dos animais foram coletados para obtenção do índice gonadosomático e para esse procedimento foi utilizada a Balança Eletrônica Digital (Slim Alta precisão 150kl Yhb1004). Fotomicrografias de cada testículo foram capturados usando Nikon Optiphot microscópio de luz (Modelo BX51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) em 200X. Essas imagens de testículos foram usadas para determinar o diâmetro dos túbulos seminíferos com o auxílio do sistema de análise de imagem automatizado Imagem versão J® 1.43n (Research Services Branch, Instituto Nacional de Mental Health, Bethesda, Maryland, EUA).

4.3 COLETAS DE TESTÍCULO, EPIDÍDIMO E AMOSTRA DE SANGUE

Os animais foram pré-anestesiados com cloridrato de xilazina 2% (40mg/kg/IM) e cloridrato de quetamina 1% (60mg/kg/IM) e submetidos à eutanásia pela administração de tiopental sódico a 2,5% (60mg/Kg/EV) através da canulação do seio venoso cervical, de acordo com a técnica descrita por Schumacher (1996). A

coleta para a realização das concentrações hormonais foi realizada em trinta e oito animais. O horário padrão de coleta ficou estabelecido às 10h da manhã, assim como foi estabelecido até 7 minutos para coleta da amostra em cada animal de 3 ml de sangue dos períodos chuvoso e seco. Para isso, o seio cervical dorsal foi esterilizado e com uma seringa de 3ml e agulha 25x7 o sangue foi coletado e colocado em um tubo sem heparina, foram mantidas em gelo por até 2 h antes de ser centrifugada durante 15 minutos a 2000-3000G e posteriormente centrifugado, logo após o soro foi armazenado em tubos 1,5ml e congelados em freezer a -20°C, segundo Owens (1980).

As concentrações de testosterona, corticosterona e estradiol foram mensuradas por radioimunoensaio. Anticorpo ^{125}I -testosterona e ^{125}I -corticosterona, por meio de conjunto diagnóstico comercial (IMMUNOTECH, IM1119, SAS, Testosterone, França e MP Bipmedicals, I125, RIA Kit 07-120102, Corticosterone, California respectivamente ver VIANA et al., 2014a para mais detalhes). A sensibilidade do ensaio para testosterona e corticosterona foi de 0.1/ml e o coeficiente de variação inter e intra-ensaios de testosterona e corticosterona foram 9 e 13,5% para referência, respectivamente. O anticorpo para testosterona apresentou reatividade cruzada a di-hidrotestosterona (DHT) foi de 18,75%, a 5 α -androstano-3 α e 17 β -diol foi de 3,0%, e a 5-androstano-3 β , 17 β -diol foi de 1,00%. A reatividade cruzada apresentada pelo anticorpo de corticosterona foi com desoxicorticosterona 2,30%, para o cortisol foi de 0,27%, para a progesterona foi de 0,17%, e para testosterona foi de 0,47%.

Para concentração de estradiol foi utilizado o anticorpo ^{125}I 17 β -estradiol (MP Bipmedicals, CT RIA Kit 07-238102, Estradiol, NY, USA) modificado para aumentar a sensibilidade para menos de 1.0 pg/ tubo de ensaio. O anticorpo apresentou reatividade cruzada com estrona de 12,5%, para o estriol 1,74%, e para equilina foi de 4,2%. Sensibilidade do ensaio de estradiol foi de 0,8 pg / tubo de ensaio. Coeficiente intraensaio de variação para o ensaio de estradiol foi de 3,0% e coeficiente de variação do ensaio de estradiol foi de 8,0%. Sensibilidade do ensaio de estradiol foi de 0.8 pg/tubo de ensaio e o coeficiente de variação inter e intra-ensaios 8 e 3%, respectivamente.

Tais hormônios foram analisados no Laboratório de Dosagens Hormonais do Instituto Genese de Análises Científicas (IgAc), São Paulo, SP. O leitor utilizado é do tipo gama wizard modelo 1470 (Perkin Elmer) – Software MultiCalc.

Posteriormente, foi realizada a abertura da cavidade celomática com serra manual de aço para a desarticulação da ponte óssea que une a carapaça ao plastrão e para a remoção de vísceras, visualização e retirada do trato reprodutor. Os fragmentos dos testículos e epidídimos foram destinados para processamento conforme metodologia definida por Assis Neto et al. (2003).

4.4 IMUNOHISTOQUIMICA

As amostras de testículos e epidídimos fixadas em paraformaldeído tamponado a 4% por 24h foram desidratadas em solução alcoólica em concentrações crescentes (70 a 100%) e diafanizadas em xilol, para posterior inclusão em blocos de parafina. Em seguida, foram obtidos cortes dos blocos de parafina com 3µm em micrótomo Leica RM2165 das amostras de testículos e epidídimos.

Em seguida, as amostras permaneceram durante 3 horas em estufa a 70 °C foram diafanizadas em xilol e hidratadas em álcool, seguido de água destilada. Na sequência, então foram aquecidas a 90° e imersas em solução tampão citrato em forno de microondas. Foi realizado o bloqueio da atividade de peroxidase endógena utilizando H₂O₂ a 3% e depois um bloqueio de proteínas com normal horse serum (Vector Labs, Burlingame, USA) e então as amostras foram incubadas com anticorpos primários foram P450aromatase, NADPH redutase e, citocromo P450c17 durante 16 horas (Quadro 1).

Quadro 1 - Lista de anticorpo primários para imunohistoquímica e western blotting

Anticorpo	Isotipo	Imunoreatividade	Diluição (Imunohistoquímica/Western)	Catálogo N°:
Aromatase	Policlonal coelho IgG	Camundongo,rato, humano,galinha, vaca, porco	1:200/1:1000	Abcam (ab18995)
Cytochrome P450 17A1	Policlonal coelho IgG	Coelho,camundongo	1:200/1:1000	Doado pelo Prof. Dr. Alan J. Conley (UC, Davis,Califórnia, USA)
P450 Reductase	Policlonal coelho IgG	Camundongo,rato,ovelha, coelho,cobaia,hamster, vaca,cão,humano,porco, macaco	1:200/1:1000	Abcam (ab13513)

FONTE: (VIANA, D. C., 2015)

Os controles negativos foram preparados utilizando anticorpos isotipo IgG (IgG de coelho normal, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, EUA). Após a incubação com anticorpo primário, conjugado com anticorpo secundário anti-mouse/rabbit Immpress Universal Kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) e em seguida foi adicionada solução amplificadora Vectstain® ABC Peroxidase Kit (Vector Labs, Burlingame, USA). Para a revelação, utilizou-se ImmPACT™ DAB (Vector Labs, Burlingame, USA). As amostras foram contra coradas com hematoxilina e em seguida montadas com lamínula. O protocolo foi adaptado do LEME – Laboratório para Estudos Morfofuncionais e Endocrinologia do Departamento de Cirurgia, FMVZ/USP, São Paulo.

4.5 WESTERN BLOTTING

As amostras de tecido testicular e epididimal congeladas foram maceradas e homogeneizadas em Polytron PT 3000 KINEMATICA® (Brinkman, Westbury, USA) em tampão de lise hipotônico contendo 10mM de TRIS/HCl 5, 5 mM de EDTA, pH 7,4, na presença de inibidores de proteases: benzamidina (20 ug/mL), pepstatina (1 ug/mL), peptidina (0,5 ug/mL), apoproteína (0,1 ug/mL) e PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride, 100 ug/mL). O homogenato foi centrifugado a 1000x durante 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi transferido para tubos de 1.5ml e armazenados a -20°C. A concentração das enzimas esteroideogênicas citocromo P450c17 foi analisada por método de Bradford (1976) (Protein Assay Kit; Bio-Rad, USA), comparando-se as medidas obtidas para as amostras com a curva padrão de albumina lida a 595 nm.

Em seguida, 50ug de proteínas totais foram desnaturadas em tampão Laemmli (15% glicerina, 0.05M Tris, 0.055 azul de bromofenol, 9% SDS) contendo 6% de beta-mercaptoetanol (1:1) e aquecidas a 95° C por 5 minutos. As amostras foram separadas eletroforicamente em gel de SDS-poliacrilamida. Após a separação, as proteínas foram transferidas para membrana de polivinilideno difluoreto (PVDF; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), sob corrente constante

de 120mA, durante 2 horas, a 4°C, em tampão Tris-HCl (Tris-HCl 12.5 mM glicina mM, 1% sds e 20% de metanol). Após a transferência, foi realizado bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos por meio de uma solução que continha TBS com detergente Tween 20 (TBS-T; 1% tween 20) e leite desnatado (5%). Nessa solução, as amostras ficaram submersas por duas horas com agitação constante e em temperatura ambiente (20-25°C). Anticorpos P450aromatase, P450c17 e NADPH redutase foram detectados com anticorpos específicos.

Após a incubação com o anticorpo primários, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1:10.000) (IgG anti-mouse/anti-coelho, ECL, Amersham Biosciences, NJ, USA) em TBS-T 1% de albumina por 2 horas, com agitação constante em temperatura ambiente. Como controle endógeno, foi utilizada beta-actina HRP conjugado anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), diluído a 1:50.000 em solução de bloqueio por 30 minutos. O sinal foi detectado pela adição de Fast Red Naftol Red (Sigma, St. Louis, USA) para fosfatase alcalina por 2 minutos. A solução reveladora utilizada foi (ECL) Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). As imagens foram capturadas por ChemiDoc Mp sistema de imagem (Bio-Rad Laboratories) e normalizadas para actina-beta (ACTB; 42 kDa), utilizando o programa ImageJ (Bio-Rad Laboratories). O protocolo é utilizado como técnica de rotina no LEME – Laboratório para Estudos Morfofuncionais e Endocrinologia do Departamento de Cirurgia, FMVZ/USP, São Paulo.

4.6 CONTAGEM CELULAR

Foram feitas vinte secções seriadas de tecido testicular dos blocos de parafina contendo os núcleos de células de sertoli aleatoriamente na fase V e que foram contadas para cada animal. Essas contagens foram corrigidas para a espessura de corte e núcleo, com base no método descrito por Abercrombie (1946) e conforme modificado por Amann e Schanbacher (1983). Devido ao fato de que o animal em estudo possuía várias etapas de células germinativas por túbulos

transversais (SOUSA et al., 2014), as contagens de células em estágio V foram analisadas em diferentes áreas/divisões.

O número total de células de Sertoli foi determinado a partir das contagens obtidas dos núcleos da célula de Sertoli e o comprimento total de túbulos (HOCHEREAU-DE-REVIERS; LINCOLN, 1978; AMANN; SCHANBACHER, 1983; COSTA et al., 2008; COSTA et al., 2010a,b). Os resultados da produção de espermatozoides (DSP) por testículo e por grama de testículo (eficiência espermatogênica) foram obtidos de acordo com a seguinte fórmula: $DSP = \text{número total de células de Sertoli por testículo} \times \text{a proporção de espermátides arredondadas para as células de Sertoli em fase V} \times \text{frequência relativa da fase V (\%)/duração da fase V}$ (FRANÇA, 1992).

O volume da célula de Leydig individual foi obtido por microscopia de luz a partir do volume nuclear e da proporção entre núcleo e citoplasma, usando uma grade de 540 interseção (GIMP). As imagens utilizadas para tal fim foram capturadas em 1000x, e 10.000x.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância foi feita através do programa GraphPad InStat para obtenção de média e desvio-padrão. Foi utilizado o teste de normalidade Cramer-von Mises para verificação da homocedasticidade entre as variáveis, e o teste para comparação de média foi Student-Newman-Keuls – SNK ($p < 0,05$), pelo fato das variáveis climáticas, biométricas e hormonais terem se apresentado instáveis com coeficiente de variância entre $15\% < CV < 30\%$.

A correlação entre as covariáveis e os níveis de testosterona foi avaliada com o teste de Pearson ($p < 0,05$) posteriormente ajustou-se um modelo de quadrados mínimos parciais com dois componentes, por validação cruzada.

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO ANATÔMICA DOS ÓRGÃOS GENITAIS MASCULINOS

Os animais do deste estudo apresentam os seguintes componentes anatômicos um par de testículos, um par de epidídimos, um par de ductos deferentes e um pênis como ilustrado na Figura 3.

Figura 3 - Anatomia do aparelho genital masculino de tartaruga (*K. scorpioides*). : Vista topográfica (A) (Td e Te), epidídimo direito e esquerdo (Ed e Ee), ducto deferente (Dde), intestino grosso (lg), pênis (P). B: Sintopia dos testículos, epidídimos e ductos deferentes. C: Testículo e epidídimo, época chuvosa (Janeiro-Junho). D: Testículo e epidídimo, época seca (Julho-Dezembro). Barra 2cm.

FONTE: (VIANA, D. C., 2015)

5.2 MORFOFISIOLOGIA

O comportamento da atividade gonadal e aumento das chuvas coincidiram sazonalmente (Figura 4). Como os dados para temperatura e fotoperíodo se mantiveram constantes durante os períodos estudados, foi dada atenção para pluviosidade. Os dados de pluviosidade foram correlacionados acontecimentos reprodutivos.

Figura 4 - Média de precipitação mensal entre novembro de 2010 a outubro de 2014 correlacionada com acontecimentos importantes no ciclo gonadal

FONTE: (VIANA, D. C., 2015)

As análises hormonais demonstraram que houve diferença significativa entre a concentração de testosterona, e coincidindo com elevado índice gonadossomático e diâmetro tubular em relação ao desenvolvimento das espermatogônias para o mês

de março, que coincidem com a estação chuvosa. Para o mês de setembro houve outra elevação da concentração de testosterona coincidindo com a espermição, na estação seca. Outros dois acontecimentos foram evidentes, um está relacionado à elevação da concentração de corticosterona no mês de junho (estação chuvosa) e o outro foi à concentração do estradiol para o mês de dezembro (estação seca), período em que a espécie está estivando na região estudada (Figura 5).

Figura 5 - Concentrações médias de estradiol, corticosterona e testosterona relacionados ao índice gonadossomático (IGS), diâmetro tubular e eventos do ciclo gonadal. [Mar (n=15); Jun (n=5); Set (n=5); Out (n=8); Dez (n=5)]. Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p<0.05$)

FONTE: (VIANA, D. C., 2015)

5.3 IMUNOHISTOQUÍMICA

Houve diferenças na imunolocalização e na intensidade das enzimas citocromo P450aromatase (P450arom), P450c17 e NADPH citocromo P450-redutase (NADPH-redutase) nos testículos e epidídimos versus os períodos chuvoso e seco.

Nos testículos, no período chuvoso foi observada imunomarcção para P450arom nas células de Leydig, células de Sertoli e proximidades das células germinais; a enzima P450c17 foi imunolocalizada nas células de Leydig, e a NADPH-redutase apresentou leve marcação do sêmen e célula de sertoli. Na época seca, a enzima p450arom e P450c17 apresentaram menor intensidade da imunolocalização nas células de Leydig, para NADPH-redutase, não foi observada imunolocalização (Figura 6).

Nos epidídimos, no período chuvoso, foi observada forte imunomarcção para P450aromatase nas células intersticiais, nas células do ductulos eferentes e no sêmen. A enzima P450c17 e a NADPH-redutase foram levemente imunolocalizada nas células apicais. No período seco, a enzima P450aromatase teve imunolocalização moderada nas células intersticiais e células do ductulo eferente. A enzima P450c17 teve imunolocalização moderada nas células intersticiais e células do ductulos eferentes e leve marcação para células basais. A NADPH-redutase apresentou forte marcação nas células intersticiais e no interior dos ductulos eferentes e fraca marcação para células basais (Figura 7). No quadro 2 as enzimas foram caracterizadas segundo intensidade de imunolocalização.

Quadro 2 - Imunolocalização das enzimas citocromo P450aromatase, P450c17 e NADPH-redutase nos testículos e epidídimos de tartarugas *K. scorpioides* com base no período chuvoso e seco

Época do ano	Tartaruga (n)	Testículo			Epidídimo		
		P450	P450c17	NAHPH	P450arom	P450c17	NAHPH
Período chuvoso	20	Cl +++, Cs +++, Se++	Cl++, Cs+	Cs+, Se+	Ci +++, De +++, Se +++	Ca +	Ca+
Período seco	18	Cl+	Cl++	-	Ci ++, De ++	Ci ++, De++, Cb+	Ci+++, De+++, Cb+

Cl (Célula de Leydig), Cs (Célula de Sertoli), Se (Sêmen), Ci (Célula intersticial), De (Ductulo eferente), Ca (Célula apical), Cb (Célula basal); (+++/++/-): forte / moderada / levemente / sem marcação

FONTE: (VIANA, D. C., 2015)

Figura 6 - Imunolocalização de citocromo P450arom, P450c17 e NADPH-redutase nos testículos de *K. scorpioides* no período chuvoso e seco. Controle negativo (G e H). A, E, F, G, H (Barra 20µm); B, C, D (Barra 50µm)

FONTE: (VIANA, D. C., 2015)

Figura 7 - Imunolocalização de citocromo P450arom, P450c17 e NADPH-redutase nos epidídimos de *K. scorioides* no período chuvoso e seco. Controle negativo (G e H). A, B, C, E, F, G, H (Barra 20µm); D (Barra 50µm)

FONTE: (VIANA, D. C., 2015)

5.4 WESTERN BLOTTING

Os resultados para as enzimas citocromo P450c17, citocromo e NADPH citocromo P450-redutase, nos testículos e epidídimo, nos períodos chuvoso e seco, foram detectadas na proteína extraída. A expressão relativa foi normalizada com actina, beta (42kDa) para todas as proteínas. Com o anticorpo NADPH-redutase, foi detectado sinal no testículo e epidídimo na posição de (37kDa). Enquanto para a enzima P450c17, há positividade (57kDa) e para a P450 aromatase, que o peso molecular é de 59 kDa para estações tanto a chuva e seca (Figura 8).

Figura 8 - Expressão das proteínas P450arom (A), P450c17 (B) e NADPH-redutase (C) nos testículos e epidídimos de tartaruga *K. scorpoides*. M(marcador – actina beta); Es (epidídimo – período seco); Ec (epidídimo – período chuvoso); Ts(testículo – período seco); Tc (testículo – período chuvoso)

5.5 MORFOMETRIA DOS COMPONENTES TESTICULARES

A quadro 3 mostra os dados relativos à morfometria do testículo de *K. scorpioides*. O índice meiótico, medido como o número de espermatídes arredondadas produzidas por paquíteno espermatócito primário, foi de 3. Houve diferença significativa entre os períodos. No período chuvoso, cada célula de Sertoli suporta quase 18 espermatídes arredondadas, enquanto no período seco, esse número foi reduzido à metade. Em relação à eficiência espermatogênica, a produção diária de espermatozoide por grama de testículo, no período chuvoso, foi mais que o dobro da estação seca.

Quadro 3 - Contagem celular, razões celulares e produção espermática em *Kinosternon scorpioides* (média $\pm$ D.P.)

Parâmetros	período chuvoso (n=20)	período seco (n=18)
Espermatídes arredondadas: células nucleadas de Sertoli	17.4 $\pm$ 0.5 ^a	8.4 $\pm$ 1.1 ^b
Número de células de Sertoli por grama de testículo (milhões)	24.8 $\pm$ 2.7 ^a	20.2 $\pm$ 0.3 ^b
Número de células de Sertoli por testículo (milhões)	19.3 $\pm$ 2.9 ^a	15.2 $\pm$ 3.8 ^a
Produção de espermatozoides por grama de testículo (milhões)	39.6 $\pm$ 3.4 ^a	13.4 $\pm$ 6.5 ^b
Produção de espermatozoides por testículo (milhões)	26.4 $\pm$ 4.8 ^a	15.9 $\pm$ 5.2 ^b

Legenda: Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$) para Student-Newman-Keuls(SNK), teste de normalidade Cramer-von Mises W-Sq 0.03979, Pr > W-Sq > 0.2500

FONTE: (VIANA, D. C., 2015)

Figura 9 - Variáveis associadas com os níveis de testosterona através do teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$)

Todas as covariáveis correlacionaram-se positivamente com as concentrações de testosterona, porém, a única correlação significativa foi entre morfometria e a concentração de testosterona. O modelo ajustado explicou 57.8% da variabilidade nas concentrações de testosterona, sendo 54% explicada pelo primeiro componente (testosterona). A associação entre os resultados da morfometria e as concentrações de testosterona foram representados principalmente pelo primeiro componente enquanto que a associação dos níveis de testosterona com a temperatura, o peso dos animais, o peso epididimal e o peso testicular, foi representada principalmente pelo segundo componente.

6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Entre os períodos chuvoso e seco foram descritas para as variáveis peso testicular e diferenças significativa para contagens celulares elevadas na época chuvosa, indicando o momento reprodutivo. Foram observadas diferenças de imunolocalização celular das enzimas P450aromatase, P450c17 e NADPH-redutase nos testículos e epidídimos. Por transferência de Western estas enzimas também estavam presentes em todos os períodos.

A morfometria das tartarugas foram similares para estudo com a mesma espécie na Região amazônica da cidade de Belém do Pará (CASTRO et al., 2006) e no estado nordeste brasileiro do estado do Maranhão (CHAVES, 2011; VIANA, 2014b) esses autores consideram animais machos adultos os que possuíam a partir de 12cm de comprimento de carapaça.

Os órgãos genitais apresentam um par de testículos, epidídimos e ductos deferentes localizados na cavidade celomática e um pênis localizado na cloaca (CARVALHO et al., 2010; SOUSA et al., 2014; VIANA et al., 2014b).

Em relação à coloração dos testículos, os órgãos coletados na época da estação seca apresentaram tonalidade amarelo ouro, informação compartilhada por Chaves (2011), e encontrada também em estudos de Noble e Noble (1940) e Ashley (1969), que descrevem forma e coloração dos testículos de aves e tartarugas em tom amarelo ouro, mas não enfatizam mudança de coloração em virtude de atividade ou período reprodutivo. Essas observações são semelhantes aos dados obtidos por Carvalho et al. (2010) e Chaves (2011) para a mesma espécie em cativeiro e Viana (2014a) para ambiente natural. Outro dado interessante, observado também por Viana (2014a), tem relação ao peso dos testículos, pois estes apresentaram maior massa no período chuvoso. Tal constatação sugere que nesse período pode ocorrer o desenvolvimento espermatogênico.

Os epidídimos apresentam-se como uma estrutura única alongada e fusiforme, inserida na superfície dorsomedial dos testículos, assim como descrita em aves (LAKE, 1957; KING et. al., 1995). O posicionamento destes é semelhante ao observado em tartarugas da mesma espécie estudada corroborado também por Chaves (2011) para animais de cativeiro e para animais do ambiente natural como foi observado na Baixada Maranhense (VIANA et al., 2013). A massa média dos

epidídimos foi maior na estação seca, e isso pode ser explicado pela presença de espermatozóides no lúmen deles. Apesar de não haver frequência tão comum como no período chuvoso, nesse momento ainda são vistos alguns animais em acasalamento. Além disso, no final do período seco, momento de transição para o chuvoso, a luz e o diâmetro tubular aumentaram gradativamente. Esse momento sugere que os animais parecem se programar para o momento de acasalamento (VIANA et al., 2013). Este aspecto também foi refletido quando foram analisados os ductos deferentes (VIANA et al., 2014c).

Nossos resultados demonstram que os testículos e epidídimos do jurará possuem as enzimas necessárias para a síntese de testosterona e estrógeno. A imunorreatividade para aromatase no testículo foi encontrada em ambas as células de Sertoli e Leydig, entretanto para os dois períodos a imunomarcacão foi ausente nas células germinativas havendo diferença na intensidade. Houve reação menos intensa em células de Leydig e bem fraca em células de Sertoli, também quando o testículo estava quiescente.

A proliferação das espermatogônias parece deslocar a imunorreatividade da P450aromatase para a luz, o que apresenta correlação com o desenvolvimento da espermatogênese. A intensidade das células de Sertoli diminui durante a fase meiótica do ciclo espermatogênico, retornando durante a fase espermiogênica. Um padrão semelhante de imunorreatividade foi observado nas células de Leydig. Células de Leydig estavam aumentadas de volume (hipertrofiadas) durante a quiescência testicular e apresentaram uma maior imunorreatividade durante a fase de maturação do ciclo espermatogênico, Gist et al. (2007) observou a imunolocalização da aromatase da tartaruga *Trachemys scripta*, e diferentemente do encontrado neste estudo, elas foram mais intensas no período quiescente. À medida em que a presença das enzimas P450aromatase e P450c17 podem prever a síntese de hormônios e secreção parece que a produção de estrógeno continua durante todo o ano, exceto durante a fase meiótica do ciclo espermatogênico.

A imunomarcacão enzimática da aromatase nos testículos de tartaruga sugere que o estrógeno possivelmente possui interferência nos eventos do processo espermatogênico. O estrógeno é cada vez mais estudado no controle da proliferação das espermatogônias tanto em testículos de anfíbio como em répteis por induzir a divisão mitótica em espermatogônias (CHIEFFI et al., 2002). No quadro 4 é

apresentado diversos achados comparando a atividade da aromatase em diversas espécies.

Nós observamos que a enzima P450c17 possui a capacidade de sintetizar andrógenos nos testículos do jurará, não só na época chuvosa, mas também no período seco. Estudos demonstraram que os andrógenos produzidos pelas células de Leydig desempenham um papel importante na regulação da espermatogênese e manutenção, tal como a conversão de espermátides arredondadas para alongadas e apoptose celular prevenindo a andrógeno-dependente dos tecidos (TENNISWOOD et al., 1992; THOMPSON, 1994).

O epidídimo da tartaruga não é regionalmente diferenciado como é no mamífero (HOLMES; GIST, 2004), mas ambos os tipos de enzimas foram vistas nas células apicais e basais ao longo do epidídimo. A tartaruga tem um ciclo reprodutivo incomum, no qual os espermatozoides produzidos no período chuvoso são armazenados no epidídimo para ser utilizados no próximo acasalamentos (GIST et al., 2001), característica que pode ser sugerida para a esta espécie aqui estudada. Os espermatozoides são mantidos nos epidídimos ao longo do ano e durante esse tempo é capaz de manter as características de motilidade (GIST et al., 2000).

Os dados apresentados podem ser mais compreendidos de acordo com Conley et al. (2012) que atribui a existência de compartimentação das enzimas envolvidas na síntese de esteróides sexuais e que em determinados compartimentos podem ter efeitos sobre a produção de estrógeno. No presente estudo, por exemplo, o epidídimo no período chuvoso apresentou marcações nas células apicais, em outro momento do período seco, essas marcações se restringiram as células basais para as enzimas citocromo P450c17, talvez esse fato possa influenciar na estocagem de espermatozoide, aspecto comum no comportamento reprodutivo dos animais deste estudo. A esteroidogênese é compartimentada em órgãos, tecidos e níveis celulares e isso pode variar entre as espécies. No entanto, com mecanismos organizacionais para determinados tecidos e extraordinária diversidade isso sugere relevância funcional. O que nesse trabalho a co-expressão das enzimas p450arom e p450c17 no período chuvoso demonstraram influenciar a espermatogênese.

Quadro 4 - P450 Aromatase no sistema reprodutor masculino adulto

Espécie	Cél. Leydig	Cél. Sertoli	Cél. Germinativa	Espermatozoide	Referência
Camundongo*	+		+	+	(NITTA et al., 1993; JANULIS et al., 1996a)
Rato*	+		+	+	(ROMMERTS; BRINKMAN, 1981; ROMMERTS et al., 1982; TSAI-MORRIS et al., 1984; PAPADOPOULOS et al., 1986; PAYNE et al., 1987; JANULIS et al., 1996b; LEVALLET; CARREAU, 1997; LEVALLET et al., 1998a; LEVALLET et al., 1998b; JANULIS et al., 1998; CARPINO et al., 2001; LANZINO et al 2001; TURNER et al., 2002)
Galo			+	+	(KWON et al., 1995)
Urso**	+	+	+		(TSUBOTA et al., 1997)
Javali	+				(CONLEY et al., 1996)
Carneiro	+				(BILINSKA et al., 1998)
Garanhã	+	+	+		(EISENHAUER et al., 1994; LEMAZURIER et al., 2001; SIPAHUTAR et al., 2003)
Ratazana do capim	+	+	+		(FRACZEK et al., 2001; KOTULA-BALAK et al., 2003; BILINSKA et al., 2001)
Truta arco-íris	+				(KOBAYASHI et al., 1998)
Tubarão cação			+		(CALLARD et al., 1985; BETKA et al., 1998)
Sagui			+		(TURNER et al., 2002)
Rhesus	+		+		(PEREYRA-MARTINEZ et al., 2001)
Humana			+	+	(HESS et al., 2001; TURNER et al., 2002; CARREU et al., 2003; LAMBARD et al., 2003; RAGO et al., 2003)
Tartaruga (<i>K. scorpionides</i>)	+	+		+	Este estudo

* Os primeiros trabalhos mostraram apenas células de Leydig sendo positivo para aromatase no testículo adulto ** Localização dependia da temporada.

FONTE: (VIANA, D. C., 2015)

A morfometria celular da espermatogênese é correlacionada com vários parâmetros, tais como a eficiência da célula de sertoli, a densidade de volume do compartimento tubular e a duração da espermatogênese (FRANÇA; CARDOSO, 1998; JOHNSON et al., 2000; FRANÇA; HESS; 2005). Em grande parte, isso se deve ao aumento de atividade nas células de sertoli, fato observado em *K. scorpioides*. Assim apontou também Sousa et al. (2014), mostrando que tal aumento é próximo aos valores observados em várias espécies de aves (LÜPOLD et al., 2011). Outro aspecto da eficiência das células de sertoli, descrito para algumas espécies de peixes (mais de 100 espermátides por célula de sertoli) (BILLARD, 1969; MATTA et al., 2002; VILELA et al., 2003; SCHULZ et al., 2005; LEAL et al., 2009) é maior comparado com *K. scorpioides*.

O fenômeno chamado estivação assemelha-se ao de hibernação, o qual ocorre com algumas espécies animais. Segundo Randall et al. (2000) o animal pode ficar nesse estado por semanas ou até mesmo por vários meses em ambiente muito frio, e Rose (1980) observou estivação pode chegar a seis meses para *Kinosternon flavescens*. Por apresentar temperatura alta e intensa na área de estudo, o *K. scorpioides* exibi dormência, período de estiva ou estivação ou de sono de verão, pois, quando da escassez de alimento, esta é uma época desfavorável para a sobrevivência da espécie em ambiente natural. Rodrigues e Borges-Nojosa (2013) observaram acasalamentos de *K. scorpioides* em cativeiro no nordeste do Brasil, e a maior incidência ocorreu durante o período das chuvas. Assim também observou Iverson (2010) para *Kinosternon scorpioides cruentatum* no México. Algumas espécies de anfíbios anuros como *Pleurodema diplolister*, encontrados na caatinga, também apresentam tal comportamento de estivação (MADELAIRE, 2012). No período chuvoso, sob o ponto de vista biológico, situa-se o momento característico do momento de acasalamento onde o macho acasala com mais de uma fêmea (POUGH et al., 2008; VIANA et al., 2014a). No quadro 5 alguns ciclos reprodutivos de tartarugas machos.

Lepidochelys kempi, do Caribe, e *Tryonix sinensis* originada do sul da China apresentaram níveis elevados de testosterona de 8,44ng/ml antes do acasalamento. Entretanto, esses níveis caíram durante o período de acasalamento 0,65ng/ml com intensa atividade espermatogênica no período mais quente do ano (LOFTS; TSUI, 1977; ROSTAL et al., 1997). Para o mês de setembro, período de inverno que

antecede a hibernação, a testosterona plasmática observada foi de 0,3ng/ml em *Chrysemys picta* foi considerada baixa (ERNST, 1971; GANZHORN; LICHT, 1983). Tartarugas *Gopherus polyphemus* do Sudoeste da Geórgia, apresentaram pico de testosterona em julho e agosto, permanecendo elevada até outubro, o que coincidiu com acasalamento e espermatogênese (LANDERS et al., 1980).

Quadro 5 - Ciclos reprodutivos de tartarugas machos

Espécie	Ciclo espermatogênico	Espermiacão	Ciclo de testosterona	Referência
<i>Chelydra serpentina</i>	Estivação	durante todo o ano	unimodal - final do verão	(WHITE; MURPHY, 1973; MAHMOUD; LICHT, 1997)
<i>Chrysemys picta</i>	Estivação	bimodal	bimodal	(CALLARD et al., 1976)
<i>Chrysemys picta dorsalis</i>	Estivação	bimodal		(MOLL, 1973)
<i>Deirochelys reticularia</i>	Estivação			(GIBBONS, 1969; EWERT et al., 2006)
<i>Graptemys ernsti</i>	Estivação	durante todo o ano		(SHEALY, 1976)
<i>Graptemys flavimaculata</i>			bimodal	(SHELBY et al., 2000; SHELBY; MENDONÇA 2001)
<i>Graptemys nigrinoda</i>	Estivação	bimodal		(LAHANAS, 1982)
<i>Graptemys oculifera</i>	Estivação			(KOFRON, 1991)
<i>Graptemys ouachitensis</i>	Estivação			(VOGT, 1980)
<i>Graptemys pseudogeographica</i>	Estivação			(TORRES-OROZCO et al., 2002)
<i>Pseudemys nelsoni</i>	Estivação			(JACKSON, 2006)
<i>Terrapene carolina</i>	Estivação	durante todo o ano	bimodal	(ALTLAND, 1951; CURRYLOW et al., 2013)
<i>Trachemys scripta</i>	Estivação	durante todo o ano		(LOVICH et al., 1990; GARSTKA et al., 1991)
<i>Kinosternon scorpioides</i>	Estivação	bimodal?	bimodal	Este estudo
<i>Kinosternon subrubrum</i>	Estivação	bimodal		(MAHMOUD; KLIČKA, 1972)
<i>Sternotherus carinatus</i>	Estivação	bimodal		(MAHMOUD; KLIČKA, 1972)

FONTE: (VIANA, D. C., 2015)

Ao estudar os níveis de testosterona em lagartos machos *Sceloporus jarrovi*, Moore (1987) observou que são mais baixos no inverno e elevados durante primavera e época de reprodução, quando os machos mostram defesa de alta intensidade territorial. Andò et al. (1992) estudou em lagarto *Podarcis s. sicula* Raf e observou um pico de 174,8 ng/ mL no período reprodutivo. As concentrações de corticosterona para as tartarugas deste estudo foram elevadas, primeiro porque valores alto são uma característica desta espécie, e segundo o método de captura de rede. Mesmo método utilizado para captura de peixes e pode ter sido a causa esta a causa, alguns estudos utilizaram métodos de captura diferentes como para a *Graptemys flavimaculata* em que se utilizou um tipo de puçá para captura, e a concentração apresentada foi somente 7ng/ml no verão, época de reprodução (SELMAN et al., 2012).

Portanto, as mudanças biométricas, morfometria celular e a esteroidogênese testicular entre os períodos chuvoso e seco sugerem que o estrógeno produzido pelas células de Leydig pode afetar a produção e a apoptose de células germinais durante o processo de espermatogênese, e a presença das enzimas P450aromatase e P450c17 em células de Leydig acompanhados com a recrudescência testicular também reforça a ideia, de que elas podem desempenhar um papel na quiescência testicular.

Em síntese, esse trabalho evidenciou que as enzimas citocromo P450, citocromo P450c17 e NADPH-citocromo P450-redutase estão presentes no testículo e epidídimo nos diferentes períodos climáticos e podem estar relacionados à síntese de testosterona em tartarugas. Os diferentes achados para biometria e espermiogênese nos períodos chuvoso e seco, o que, nos leva a sugerir um estado de quiescência durante o período seco e atividade espermatogênica no período chuvoso, semelhante ao que ocorre com outras espécies de tartarugas que apresentam comportamento reprodutivo sazonal.

REFERÊNCIAS

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. **The Anatomical Record**, v. 94, p. 238-248, 1946.
- ACUÑA-MESÉN, R. A. Variación morfométrica y características ecológicas del habitat de la tortuga candado *Kinosternon scorpioides* en Costa Rica (Chelonia, Kinosternidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 54, n.3, p. 537-547, 1994.
- ALTLAND, P. D. Observations on the structure of the reproductive organs of the Box Turtle. **Journal of Morphology**, v. 89, p. 599-621, 1951.
- ALVAREZ DEL TORO, M. 1983. Los Reptiles de Chiapas. Tercera Edición, Corregida, y Aumentada. Los Tuxtlas, México: Instituto Historia Natural, 248 pp.
- AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B. D. Physiology of male reproduction. **Journal Animal Science**, v. 57, p. 380-403, 1983.
- ANDÒ, S.; CIARCIA, G.; PANNO, M. L.; IMBROGNE, O.; TARANTINO, G.; BUFFONE, M.; BERALDI, E.; ANGELINI, F.; BOTTE, V. Sex steroids levels in the plasma and testis during the reproductive cycle of lizard *Podarcis s. sicula* Raf. **General and Comparative Endocrinology**, v. 85, p. 1-7, 1992.
- ANUNCIACAO, A. R. A.; ARAUJO, L. P. F.; DOURADO, D. F.; VIANA, D. C.; SOUSA, A. L.; LIMA, F. S.; LIMA, I. O.; SOUSA, T. M. Aspecto biológico e biométrico do desenvolvimento de jurará (*Kinosternon scorpioides*, Linnaeus, 1766) criado em cativeiro. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 1, p. 1-3, 2011.
- ANUNCIACAO, A. R. A.; OLIVEIRA, A. S.; MIGLINO, M. A.; COSTA, A. R.; VIANA, D. C.; SOUSA, A. L. Desenvolvimento embrionário de jurará (*Kinosternon scorpioides*, Linnaeus, 1766). **O Anatomista**, v. 3, v. 333, 2012.
- ARROYO, M. A. M. **Ultraestrutura e expressão das enzimas**: citocromo P450 aromatase e citocromo p450C17(17- α -hidroxilase/17,20-liase) nas diferentes fases do desenvolvimento da via espermática e espermatogênese em cutia (*Dasyprocta sp.*) criada em cativeiro. 2013. 117 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2013.
- ASHLEY, L. M. **Laboratory anatomy of turtle**. 6th ed. W.C. Brown Company Publishers, Debuque, 47p, 1969.
- ASSIS NETO, A. C.; CARVALHO, M. A. M.; MELO, M. I. V.; MIGLINO, M. A.; OLIVEIRA, M. F.; MARIANA, A. N. B. Fases do desenvolvimento e diferenciação testicular em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 71-79, 2003.
- ATLAS DO MARANHÃO. **Laboratório de geoprocessamento – UEMA**. São Luís: GEPLAN, 2002. p. 44.
- BERRY, J. F. IVERSON, J. B. *Kinosternon scorpioides*. **Catalogue of American Amphibians and Reptiles**, v. 725, p. 1-11, 2001.

BERRY, J. F.; J. B. IVERSON. *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus 1766) – Scorpion Mud Turtle. In: RHODIN A. G. J.; PRITCHARD P. C. H.; VAN DIJK P. P.; SAUMURE R. A.;

BUHLMANN, K. A.; IVERSON J. B.; MITTERMEIER, R. A. (Ed.). **Conservation biology of freshwater turtles and tortoises**: a compilation project of the IUCN/SSC tortoise and freshwater turtle specialist group. [S.l]: *Chelonian Research Foundation*, 2011. p. 0631–063. (Chelonian Research Monographs, 5).

BETKA, M.; CALLARD, G. V. Negative feedback control of the spermatogenic progression by testicular oestrogen synthesis: insights from the shark testis model. **Apmis**, v. 106, p. 252-7, 1998.

BILINSKA, B.; LESNIAK, M.; SCHMALZ, B. Are ovine Leydig cells able to aromatize androgens? **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 9, p. 193-199, 1998.

BILINSKA, B.; SCHMALZ-FRACZEK, B.; KOTULA, M.; CARREAU, S. Photoperiod-dependent capability of androgen aromatization and the role of estrogens in the bank vole testis visualized by means of immunohistochemistry. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 178, p. 189-198, 2001.

BILLARD, R. La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. I—estimation du nombre de generation goniales etrendement de la spermatogenèse. **Ann Biol Anim Biochim Biophys**, v. 9, p. 251-271, 1969.

BRADFORD, M. M. A dye binding assay for protein. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CABRERA, M. R.; COLANTONIO, S. E. Taxonomic Revision of the South American Subspecies of the Turtle *Kinosternon scorpioides*. **Journal of Herpetology**, v. 31, n. 4, p. 507-513, 1997.

CALLARD, I. P.; CALLARD, G. V.; LANCE, V.; ECCLES, S. Seasonal changes in testicular structure and function and the effects of gonadotropins in the freshwater turtle, *Chrysemys picta*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 30, p. 347-356, 1976.

CALLARD, G. V.; CANICK, J. A.; PUDNEY, J. Estrogen synthesis in Leydig cells: structural–functional correlations in Necturus testis. **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 461-479, 1980.

CALLARD, G. V.; PUDNEY, J. A.; MAK, P.; CANICK, J. A. Stage-dependent changes in steroidogenic enzymes and estrogen receptors during spermatogenesis in the testis of the dogfish, *Squalus acanthias*. **Endocrinology**, v. 117, p. 1328-1335, 1985.

CARPINO, A.; PEZZI, V.; RAGO, V.; BILINSKA, B.; ANDO, S. Immunolocalization of cytochrome P450 aromatase in rat testis during postnatal development. **Tissue Cell**, v. 33, p. 349-353, 2001.

CARREAU, S.; LAMBARD, S.; DELALANDE, C.; DENIS-GALERAUD, I.; BILINSKA, B.; BOURGUIBA, S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 35, 2003.

CARVALHO, R. C.; OLIVEIRA, S. C. R.; BOMBONATO, P. P.; OLIVEIRA, A. S.; SOUSA, A. L. Morphology of the male genital organs of the Scorpion Mud Turtle *Kinosternon scorpioides* (Chelonia: Kinosternidae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 289-294, 2010.

CASTRO, A. B. Biologia Reprodutiva e crescimento do muçã *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1776) em cativeiro. **Dissertação** (Mestrado) Universidade Federal do Pará, centro de Ciências Agrárias, Núcleo de estudos em Ciência Animal, Belém- PA, 2006.

CHAVES, E. P.; OLIVEIRA, S. C. R.; ARAÚJO, L. P. F.; OLIVEIRA, A. S.; MIGLINO, M. A.; ABREU-SILVA, A. L.; MELO, F. A.; SOUSA, A. L. Morphological aspects of the ovaries of turtle *Kinosternon scorpioides* raised in captivity. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 667-671, 2012.

CHAVES, L. P. F. A. Órgãos genitais masculino e nível sérico de testosterona de jurará (*Kinosternon scorpioides*, Linnaeus, 1766) criado em cativeiro na região da baixada maranhense no estado do maranhão. 2011. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.

CHIEFFI, P.; D'AMATO, L. C.; GUARINO, F.; SALVATORE, G.; FRANCESCO ANGELINI, F. Estradiol induces spermatogonial proliferation through mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1/2) Activity in the lizard (*Podarcis s. sicula*). **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 218-225, 2002.

CONLEY, A. J.; CORBIN, C. J.; HINSHELWOOD, M. M.; LIU, Z.; SIMPSON, E. R.; FORD, J. J.; HARADA, N. Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 497-505, 1996.

CONLEY, A. J.; CORBIN, C. J.; HUGHES, A. L. Adaptive Evolution of Mammalian Aromatases: Lesson from Suiformes. **Journal of Experimental Zoology**, v. 311, n. 1, p. 346-357, 2009.

CONLEY, A. J.; CORBIN, C. J.; THOMAS, J. L.; GEE, N. A.; LASLEY, B. L.; MOELLER, B. C.; STANLEY, S. D.; BERGER, T. Costs and Consequences of Cellular Compartmentalization and Substrate Competition among Human Enzymes Involved in Androgen and Estrogen Synthesis. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 1, p. 1-8, 2012.

CONLEY, A.; HINSHELWOOD, M. Mammalian Aromatases. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 685-695, 2001.

COSTA, G. M. J.; CHIARINI-GARCIA, H.; MORATO, R. G.; ALVARENGA, R. L. L. S.; FRANÇA, L. R. Duration of spermatogenesis and daily spermproduction in the jaguar (*Panthera onca*). **Theriogenology**, v. 70, p. 1136-1146, 2008.

COSTA, G. M.; LEAL, M. C.; FERREIRA, C. S.; GUIMARÃES, D. A.; FRANÇA, L. R. Duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in 2 large neotropical

rodent species: the agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Agouti paca*). **Journal of Andrology**, v. 31, n. 5, p. 489-99, 2010a.

COSTA, G. M.; LEAL, M. C.; SILVA, J. V.; FERREIRA, A. C.; GUIMARÃES, D. A.; FRANÇA, L. R. Spermatogenic cycle length and sperm production in a feral pig species (collared peccary, *Tayassu tajacu*). **Journal of Andrology**, v. 31, n. 2, p. 221-30, 2010b.

COSTA, H. C.; MOLINA, F. B.; SÃO-PEDRO, V. A.; FEIO, R. N. Reptilia, Testudines, Kinosternidae, *Kinosternon scorpioides scorpioides* (Linnaeus, 1766): Distribution extension. **Check List**, v.6, n.2, p. 314-315, 2010c.

CURRYLOW, A. F.; TIFT, M. S.; MEYER, J. L.; CROCKER, D. E.; WILLIAMS, R. N. Seasonal variations in plasma vitellogenin and sex steroids in male and female Eastern Box Turtles, *Terrapene carolina carolina*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 180, p. 48-55, 2013.

DE KRESTER, D. M.; KERR, J. B. The cytological of testis. In: KNOBIL, E., NEILL, J. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1988. p. 837-932.

DELDUQUE, M. Ficha do bicho: muçua. **Globo Rural**, n. 176, p. 83-84, 2000.

EISENHAUER, K. M.; MCCUE, P. M.; NAYDEN, D. K.; OSAWA, Y.; ROSER, J. F. Localization of aromatase in equine Leydig cells. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 11, p. 291-298, 1994.

ERNST, C. H. Sexual cycles and maturity of the turtle, *Chrysemys picta*. **Biological Bulletin**, v. 140, p. 191-200, 1971.

EWERT, M. A.; JACKSON, D. R.; BUHLMANN, K. A.; MEYLAN, P. A. *Deirochelys reticularia*—Chicken Turtle, p. 249-259. In: **Biology and Conservation of Florida Turtles**. P. A. Meylan (ed.). Chelonian Research Monographs, n. 3. 2006.

FORERO-MEDINA, G.; CASTANO-MORA, O. V.; MONTENEGRO, O. Abundance, population structure, and conservation of *Kinosternon scorpioides albogulare* on the Caribbean island of San Andres, Colombia. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 6, n. 2, p. 163-169, 2007.

FRACZEK, B.; BOURGUIBA, S.; CARREAU, S.; BILINSKA, B. Immunolocalization and activity of aromatase in the bank vole testes. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 39, p. 315-319, 2001.

FRANÇA, L. R. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and Sertoli cell index. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 12., 1992, Amsterdam. Proceedings... The Netherlands: Elsevier 1992. v. 4, p. 1716-1718.

FRANÇA, L. R.; CARDOSO, F. M. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar. **Tissue and Cell**, v. 30, n. 5, p. 573-82, 1998.

FRANÇA, L. R.; HESS, R. A. Structure of the Sertoli cell. In: SKINNER, M.; GRISWOLD, M. (Ed.). **Sertoli cell biology**. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2005; 19-40.

GANZHORN, D.; LICHT, P. Regulation of seasonal gonadal cycles by temperature in the painted turtle, *Chrysemys picta*. **Copeia**, v. 1983, p. 347-358, 1983.

GARSTKA, W. R.; COOPER, W. E.; Wasmund, K. W.; LOVICH, J. E. Male sex steroids and hormonal control of male courtship behavior in the Yellow-Bellied Slider Turtle, *Trachemys scripta*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 98, p. 271-280, 1991.

GIBBONS, J. W. Ecology and population dynamics of the Chicken Turtle, *Deirochelys reticularia*. **Copeia**, v. 1969, p. 669-676, 1969.

GIST, D. H.; TURNER, T. W.; CONGDON, J. D. Chemical and thermal effects on the viability and motility of spermatozoa from the turtle epididymis. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 119, p. 271-277, 2000.

GIST, D. H.; DAWES, S. M.; TURNER, T. W.; SHELDON, S.; CONGDON, J. D. Sperm storage in turtles: a male perspective. **Journal of Experimental Zoology**, v. 292, p. 180-186, 2001.

GIST, D. H.; BRADSHAW, S.; MORROW, C. M. K.; CONGDON, J. D., HESS, R. A. Estrogen response system in the reproductive tract of the male turtle: An immunocytochemical study. **General and Comparative Endocrinology**, v.151, p. 27-33, 2007.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 8. ed. São Paulo: Manole, 2005. p. 391-407.

HAYAKAWA, D.; SASAKI, M.; SUZUKI, M.; TSUBOTA, T.; IGOTA, H.; KAJAKI, K.; KITAMURA, N. Immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the testis of the sika deer (*Cervus nippon*) during developmental and seasonal changes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 1, p. 117-123, 2010.

HEJMEJ, A.; GORAZD, M.; KOSINIAK-KAMYSZ, K.; WISZNIEWSKA, B.; SADOWSKA, J.; BILINSKA, B. Expression of aromatase and oestrogen receptors in reproductive tissues of the stallion and a single cryptorchid visualised by means of immunohistochemistry. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 534-547, 2005.

HESS, R. A.; BUNICK, D.; BAHR, J. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract - a review. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 178, p. 29-38, 2001.

HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T.; LINCOLN, G. A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elephus*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 209-213, 1978.

HOLMES, H. J.; GIST, D. H. Excurrent duct system of the male turtle *Chrysemys picta*. **Journal of Morphology**, v. 261, p. 312-322, 2004.

IVERSON, J. B. A revised checklist with distribution maps of the turtles of the world. Richmond: **Privately Printed**. 1992. 374 p.

IVERSON, J. B. Reproduction in the Red-Cheeked Mud Turtle (*Kinosternon scorpioides cruentatum*) in southeastern Mexico and Belize, with comparisons across the species range. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 9, p. 250-261, 2010.

IVERSON, J. B.; LE, M.; INGRAM, C.; Molecular phylogenetics of the mud and musk turtle family Kinosternidae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, n. 3, p. 929-39, 2013.

JACKSON, D. R. *Pseudemys nelson* - Florida Red-Bellied Turtle, p. 313-324. In: **Biology and Conservation of Florida Turtles**. MEYLAN, P. A. (ed.). Chelonian Research Monographs n. 3. 2006.

JANULIS, L.; BAHR, J. M.; HESS, R. A.; BUNICK, D. P450 aromatase messenger ribonucleic acid expression in male rat germ cells: detection by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 651-658, 1996a.

JANULIS, L.; HESS, R. A.; BUNICK, D.; NITTA, H.; JANSSEN, S.; ASAWA, Y.; BAHR, J. M. Mouse epididymal sperm contain active P450 aromatase which decreases as sperm traverse the epididymis. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 111-116, 1996b.

JANULIS, L.; BAHR, J. M.; HESS, R. A.; JANSSEN, S.; OSAWA, Y.; BUNICK, D. Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. **Journal of Andrology**, v. 19, p. 65-71, 1998.

JOHNSON, L.; VARNER, D. D.; ROBERTS, M. E.; SMITH, T. L.; KEILLOR, G. E.; SCRUTCHFIELD, W. L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 471-480, 2000.

KING, A. S. Aparelho urogenital das aves. In: GETTY, R. **Anatomia dos Animais Domésticos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1798-1805, 1995.

KOBAYASHI, T.; NAKAMURA, M.; KAJIURA-KOBAYASHI, H.; YOUNG, G.; NAHAHAMA, Y. Immunolocalization of steroidogenic enzymes (P450 scc, P450c17, P450 arom, and 3beta-HSD) in immature and mature testis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Cell and Tissue Research**, v. 292, p. 573-577, 1998.

KOFRON, C. P. Aspects of ecology of the threatened Ringed Sawback Turtle, *Graptemys oculifera*. **Amphibia- Reptilia**, v. 12, p. 161-168, 1991.

KOMATSU, T.; TSUBOTA, T.; YAMAMOTO, Y.; ATOJI, Y.; SUZUKI, Y. Seasonal changes in the immunocalization of steroidogenic enzymes in the testis of the

Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, 521-529, 1997.

KOTULA-BALAK, M.; SLOMCZYNSKA, M.; FRACZEK, B.; BOURGUIBA, S.; TABAROWSKI, Z.; CARREAU, S.; BILINSKA, B. Complementary approaches demonstrate that cellular aromatization in the bank vole testis is related to photoperiod. **European Journal of Histochemistry**, v. 47, p. 55-62, 2003.

KWON, S.; HESS, R. A.; BUNICK, D.; NITTA, H.; JANULIS, L.; OSAWA, Y.; BAHR, J. M. Rooster testicular germ cells and epididymal sperm contain P450 aromatase. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 1259-1264, 1995.

KWON, S.; HESS, R. A.; BUNICK, D.; KIRBY, J. D.; BAHR, J. M. Estrogen receptors are present in the epididymis of the rooster. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 378-384, 1997.

LAHANAS, P. N. Aspects of the life history of the Southern Black-Knobbed Sawback, *Graptemys nigrinoda delticola* Folkerts and Mount. Unpubl. **Ph.D.** diss., Auburn University, Auburn, Alabama. 1982.

LAKE, P. E. The male reproductive tract of the fowl. **Journal of Anatomy**, v. 91, p. 116-129, 1957.

LAMBARD, S.; GALERAUD-DENIS, I.; BOURAIMA, H.; BOURGUIBA, S.; CHOCAT A.; CARREAU, S. Expression of aromatase in human ejaculated spermatozoa: a putative marker of motility. **Molecular Human Reproduction**, v. 9, p. 117-124, 2003.

LANDERS, J. L.; GARNER, J. A.; McRAE, W. A. Reproduction of Gopher Tortoises (*Gopherus polyphemus*) in Southwestern Georgia. **Herpetologica**, v. 36, n. 4, p. 353-361, 1980.

LANZINO, M.; CATALANO, S.; GENISSEL, C.; ANDO, S.; CARREAU, S.; HAMRA, K.; MCPHAUL, M. J. Aromatase messenger RNA is derived from the proximal promoter of the aromatase gene in Leydig, Sertoli, and germ cells of the rat testis. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1439-1443, 2001.

LEAL, M. C.; CARDOSO, E. R.; NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W. Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 1, p. 177-87, 2009.

LEMAZURIER, E.; SOURDAINE, P.; NATIVELLE, C.; PLAINFOSSE, B.; SERALINI, G. Aromatase gene expression in the stallion. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 178, p. 133-139, 2001.

LEVALLET, J.; CARREAU, S. In vitro gene expression of aromatase in rat testicular cells. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie**, v. 320, p. 123-129, 1997.

LEVALLET, J.; MITTRE, H.; DELARUE, B.; CARREAU, S. Alternative splicing events in the coding region of the cytochrome P450 aromatase gene in male rat germ cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 20, p. 305-312, 1998a.

LEVALLET, J.; BILINSKA, B.; MITTRE, H.; GENISSEL, C.; FRESNEL, J.; CARREAU, S. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in rat testicular cells. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 919-926, 1998b.

LOFTS, B.; TSUI, H. W. Histological and histochemical changes in the gonads and epididymides of the male soft-shelled turtle *Trionyx sinensis*. **Journal of Zoology**, v.181, p.57-68, 1977.

LOVICH, J. E.; GARSTKA, W. R.; COOPER, W. E. Female participation in courtship behavior of the turtle *Trachemys scripta*. **Journal of Herpetology**, v. 24, p. 422-424, 1990.

LÜPOLD, S.; WISTUBA, J.; DAMM, O. S.; RIVERS, J. W.; BIRKHEAD, T. R. Sperm competition leads to functional adaptations in avian testes to maximize sperm quantity and quality. **Reproduction**, v. 141, n. 5, p. 595-605, 2011.

MADELAIRE, C. B. Relação sazonal entre reprodução, imunidade e ocorrência de endoparasitas em anfíbios anuros da Caatinga. 2012. 89f. **Dissertação** (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

MAHMOUD, I. Y.; KLIKA, J. Seasonal gonadal changes in kinosternid turtles. **Journal of Herpetology**, v. 6, p. 183-189, 1972.

MAHMOUD, I. Y.; LICHT, P. Seasonal changes in gonadal activity and the effects of stress on reproductive hormones in the Common Snapping Turtle, *Chelydra serpentina*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 107, p. 359-372, 1997.

MATTA, S. L. P.; VILELA, D. A. R.; GODINHO, H. P.; FRANÇA, L. R. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Endocrinology**, v. 143, n.3, p. 970-978, 2002.

MOLINA, F. B. Some Comments of Turtle Conservation in Brazilian Zoos. Revista Holos – **Órgão informativo do Centro de Estudos ambientais da Universidade Estadual Paulista**. SP. 221-235p. 1999.

MOLL, E. O. Latitudinal and intersubspecific variation in reproduction of the Painted Turtle, *Chrysemys picta*. **Herpetologica**, v. 29, p. 307-318, 1973.

MOORE, M. C.; MARLER, C. A. Effects of testosterone manipulations on nonbreeding season territorial aggression in free-living male lizards, *Sceloporus jarrovi*. **General and Comparative Endocrinology**. v. 65, n. 2, p. 225-232, 1987.

NITTA, H.; BUNICK, D.; HESS, R. A.; JANULIS, L.; NEWTON, S. C.; MILLETTE, C. F.; OSAWA, Y.; SHIZUTA, Y.; TODA, K.; BAHR, J. M. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. **Endocrinology**, v. 132, p. 1396-1401, 1993.

NOBLE, G. A.; NOBLE, E. R. **A Brief Anatomy of Turtle**. London: Hamphrey Oxford University Press, 49p, 1940.

OLIVEIRA, S. C. R.; PEREIRA, L. A.; MACHADO JR., A. A. N.; OLIVEIRA, A. S.; SOUSA, L. M. M. C.; SOUSA A. L. Distribuição arterial dos principais vasos da cavidade celomática em *Kinosternon scorpioides scorpioides*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 893-898, 2009.

OWENS, D. W. The comparative reproductive physiology of sea turtles. **American Zoologist**, v. 20, p. 547-563, 1980.

PAPADOPOULOS, V.; CARREAU, S.; SZERMAN-JOLY, E.; DROSDOWSKY, M. A.; DEHENNIN, L.; SCHOLLER, R. Rat testis 17beta-estradiol: identification by gas chromatography–mass spectrometry and age related cellular distribution. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 24, p. 1211-1216, 1986.

PAYNE, A. H.; PERKINS, L. M.; GEORGIU, M.; QUINN, P. G. Intratesticular site of aromatase activity and possible function of testicular estradiol. **Steroids**, v. 50, p. 435-448, 1987.

PEREIRA, E. P.; VIANA, D. C.; SOUSA, A. L.; CHAVES, D. P.; CHAVES, E. P.; MACEDO SOBRINHO, I. C.; MILHOMEM, M. N.; ARAUJO, L. P. F. Descrição Anatômica do Circuito Venoso da Região Posterior do corpo do Jurará (*Kinosternon scorpioides*, Linnaeus, 1766). **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 1, p 1-3, 2011.

PEREIRA, J. G. Estudo histológico e histoquímico do tubo digestivo e do pâncreas do *Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766 (Reptila, Chelonia, Kinosternidae), muçua. 2000. 148f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

PEREIRA, L. A.; SOUSA, A. L.; LEMOS, J. J. S. Extrativismo de jurará *Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766 (Reptila, Chelonia, Kinosternidae) e avaliação sócio-ambiental dos pescadores no Município de São Bento-MA. In: SILVA, A.C.; FORTES, J.L.O. **Diversidade Biológica Uso e conservação de Recursos Naturais no Maranhão**. Projeto e ações em Biologia e Química. v. II. 2007, p.269-299.

PEREYRA-MARTINEZ, A. C.; ROSELLI, C. E.; STADELMAN, H. L.; RESKO, J. A. Cytochrome P450 aromatase in testis and epididymis of male rhesus monkeys. **Endocrine**, v. 16, p. 15-19, 2001.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; MEISER, J. B. **A Vida dos Vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 2008, 699p.

PRAPORSKI, S.; NG, S. M.; NGUYEN, A. D.; CORBIN, C. J.; ADAM MECHLER, A.; ZHENG, J.; CONLEY, A. J.; MARTIN, L. L.. Organization of cytochrome P450 involved in sex steroids synthesis. **Journal of Biological Chemistry**. v. 284, n. 48, p. 33224-33232, 2009.

PRICHARD, P. C.; TREBBAU P. **The Turtles of Venezuela**. Society the study of amphibians and reptiles. Ithaca. 1984, 403p.

RAGO, V.; BILINSKA, B.; PALMA, A.; ANDO, S.; CARPINO, A. Evidence of aromatase localization in cytoplasmic droplet of human immature ejaculated spermatozoa. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 41, p. 23-27, 2003.

RANDALL, D.; BURGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia Animal: mecanismos e adaptações**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 729p.

REDDY, P. R. K.; PRASAD, M. R. N. Hormonal control of the maintenance of spermatogenesis and sexual segment in the Indian house lizard *Hemidactylus flaviviridis*. **General and comparative endocrinology**. v.14, p. 15-24, 1970.

RODRIGUES, J. F. M.; BORGES-NOJOSA, D. M. Does *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) (Testudines: Kinosternidae) prefer to reproduce in clean water? **Herpetology Notes**, v. 6, p. 519-521, 2013.

ROMMERTS, F. F.; BRINKMAN, A.O. Modulation of steroidogenic activities in testis Leydig cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 21, n. 15-28, 1981.

ROMMERTS, F. F.; JONG, F. H.; BRINKMANN, A. O.; VAN DER MOLEN, H. J.: Development and cellular localization of rat testicular aromatase activity. **Journal of Reproduction & Infertility**, v. 65, n. 281-288, 1982.

ROSE, F. L. Turtles in arid and semiarid regions. **Bulletin of the Ecological Society of America**, v. 61, p. 89, 1980.

ROSTAL, C. D.; OWENS, D. W.; GRUMBLES, J. S.; MACKENZIE, D. S.; AMOSS JR, M. S. Seasonal reproductive cycle of the Kemp's Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys kempi*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 109, p. 232-243, 1997.

SANTOS, E. **Zoologia Brasileira**. BeloHorizonte: Vila Rica, 1994. 263 p.

SCHULZ, R. W.; MENTING, S.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; VILELA, D. A. R.; GODINHO, H. P. Sertoli cell proliferation in the adult testis—evidence from two fish species belonging to different orders. **Biology of Reproduction**, v. 73, n.5, p. 891-898, 2005.

SCHUMACHER, J. Reptiles and amphibians. In: THURMON, J. C.; TRAQUILLI, W. J.; BENSON, G. L. **Lumb & Jones Veterinary Anesthesia**. 3. ed. Baltimark: WILLIAMS; WILKINS, 1996, p. 6710-685.

SELMAN, W.; JAWOR, J. M.; QUALLS, C. P. Seasonal variation of corticosterone levels in *Graptemys flavimaculata*, an imperiled freshwater turtle. **Copeia**, v. 4, p. 698-705, 2012.

SHEALY, R. M. The natural history of the Alabama Map Turtle, *Graptemys pulchra* Baur in Alabama. **Bulletin of the Florida State Museum**, v. 21, p. 47-111, 1976.

- SHELBY, J. A.; MENDONCA, M. T. Comparison of reproductive parameters in male Yellow-Blotched Map Turtles (*Graptemys flavimaculata*) from a historically contaminated site and a reference site. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 129, p. 233-242, 2001.
- SHELBY, J. A.; MENDONCA, M. T.; HORNE, B. D.; SEIGEL, R. A. Seasonal variation in reproductive steroids of male and female Yellow-Blotched Map Turtles, *Graptemys flavimaculata*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 119, p. 43-51, 2000.
- SIPAHUTAR, H.; SOURDAINE, P.; MOSLEMI, S.; PLAINFOSSE, B.; SERALINI, G. E. Immunolocalization of aromatase in stallion Leydig cells and seminiferous tubules. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 51, p. 311-318, 2003.
- SOUSA, A. L.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; COSTA, G. M. J.; FRANÇA, L. R. Spermatogenic cycle length and sperm production in the freshwater turtle *Kinosternon scorpioides*. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 2, p. 1-10, 2014.
- SOUSA, A. L.; OLIVEIRA, A. S.; CHAVES, D. P.; SILVA JUNIOR, J. R.; MIGLINO, M. A.; PINHEIRO, M. S. S.; CARVALHO, R. C.; CHAVES, L. P. F. A.; CHAVES, E. P.; ANUNCIACAO, A. R. A.; DOURADO, D. F.; COSTA, A. R.; CALDAS, R. L.; SOUSA, T. M. **Conhecendo o jurará (*Kinosternon scorpioides*) você sabia que esta tartaruga faz parte da fauna silvestre maranhense?** 1ed. São Luís: Editora, 2013, p. 199-217.
- STRYER, L. **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1000 p.
- TENNISWOOD, M. P.; GUENETTE, R. S.; MOOIBROEK, M.; WONG, P.; WELSH, J. E. Active cell death in hormone-dependent tissue. **Cancer Metastasis Review**, v. 11, p. 197-220, 1992.
- THOMPSON, E. B. Apoptosis and steroid hormones. **Molecular Endocrinology**, v. 11, p. 665-673, 1994.
- TORRES-OROZCO, R. E.; JIMENEZ-SIERRA, C. L.; VOGT, R. C.; Benitez, J. V. Neotropical tadpoles: spatial and temporal distribution and habitat use in a seasonal lake in Veracruz, Mexico. **Phyllomedusa**, v. 1, p. 81-91, 2002.
- TSAI-MORRIS, C. H.; AQUILANO, D. R.; DUFAU, M. L. Gonadotropic regulation of aromatase activity in the adult rat testis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 438, p. 666-669, 1984.
- TSUBOTA, T.; HOWELL-SKALLA, L.; NITTA, H.; OSAWA, Y.; MASON, J. I.; MEIERS, P. G.; NELSON, R. A.; BAHR, J. M. Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in the male black bear *Ursus americanus*. **Journal of Reproduction & Infertility**, v. 109, p. 21-27, 1997.
- TURNER, K. J.; MACPHERSON, S.; MILLAR, M. R.; MCNEILLY, A. S.; WILLIAMS, K.; CRANFIELD, M.; GROOME, N. P.; SHARPE, R. M.; FRASER, H. M.; SAUNDERS, P. T. Development and validation of a new monoclonal antibody to mammalian aromatase. **Journal of Endocrinology**, v. 172, p. 21-30, 2002.

TURTLE TAXONOMY WORKING GROUP (RHODIN, A. G. H.; PARHAM, J. F.; VAN DIJK, P. P.; IVERSON, J. B.) Turtles of the World: Annotated Checklist of Taxonomy and Synonymy, 2009 Update, with Conservation Status Summary. **Chelonian Research Monographs**, v. 5, p. 39-84, 2009.

VANZOLINI, P. E.; RAMOS-COSTA, A. M. M.; VITT, L. J. Répteis das caatingas. Rio de Janeiro: **Academia Brasileira de Ciências**. 1980. p. 136-140.

VIANA, D. C. Biologia reprodutiva e dosagem hormonal de jurará (*Kinosternon scorpioides* - Linnaeus - 1776): Estudo em ambiente natural no Município de São Bento – Baixada Maranhense. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2012, 105p.

VIANA, D. C.; RUI, L. A.; MIGLINO, M. A.; ARAUJO, L. P. F.; OLIVEIRA, A. S.; SOUSA, A. L. Morphological study of epididymides in the scorpion mud turtle in natural habitat (*Kinosternon scorpioides* - Linnaeus, 1776). **Biotemas**, v. 26, p. 153-162, 2013.

VIANA, D. C.; ANUNCIACAO, A. R. A.; SANTOS, A. C.; ASSIS NETO, A. C.; MIGLINO, M. A.; OLIVEIRA, C. A.; OLIVEIRA, A. S.; SOUSA, A. L. Plasma testosterone and seasonal reproductive changes in the Scorpion Mud Turtle. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 46, p. 1641-1650, 2014a.

VIANA, D. C.; SANTOS, A. C.; ARAUJO, L. P. F.; OLIVEIRA, A. S.; ASSIS NETO, A. C.; SOUSA, A. L. Body and testicular biometric parameters of the scorpion mud turtle (*Kinosternon scorpioides*). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 36, p. 477-481, 2014b.

VIANA, D. C.; RUI, L. A.; SANTOS, A. C.; MIGLINO, M. A.; ASSIS NETO, A. C.; ARAUJO, L. P. F.; OLIVEIRA, A. S.; SOUSA, A. L. Seasonal morphological variation of the vas deferens of Scorpion Mud Turtle (*Kinosternon scorpioides*). **Biota Neotropica**, v. 14, p. 1-5, 2014c.

VILELA, D. A. R.; SILVA, S. G. B.; PEIXOTO, M. T. D.; GODINHO, H. P.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, p. 187-190, 2003.

VOGT, R. Natural history of the map turtles *Graptemys pseudogeographica* and *G. ouachitensis* in Wisconsin. **Tulane Studies in Zoology and Botany**, v. 22, p. 17-48, 1980.

WHITE, J. B.; MURPHY, G. G. The reproductive cycle and sexual dimorphism of the Common Snapping Turtle, *Chelydra serpentina serpentina*. **Herpetologica**, v. 29, p. 240-246, 1973.

WIBBELS, T.; OWENS, D.; ROSTAL, D. Soft plastra of adult male sea turtles: an apparent secondary sexual characteristics. **Herpetology**, v.22, p.47-59, 1991.

YANG, J. H.; MENSHENINA, J.; CUNHA, G. R.; PLACE, N.; BASKIN, L. S. Morphology of Mouse External Genitalia: Implications for a Role of Estrogen in Sexual Dimorphism of the Mouse Genital Tubercle. **The Journal of Urology**, v. 184, n. 4, p. 1604-1609, 2010.