

**SERVIÇOS DE AVALIAÇÃO DA
INTERFERÊNCIA DA ATIVIDADE DE E&P NO
PÓLO PRÉ-SAL DA BACIA DE SANTOS
SOBRE AS AVES, QUELÔNIOS E
MAMÍFEROS MARINHOS E ESTRUTURAÇÃO
DA REDE DE ATENDIMENTO
VETERINÁRIO NO LITORAL DE ESTADOS DO
SUDESTE E SUL DO BRASIL**

**Protocolos de Atividades
6 - Estimativas de Idade e Maturidade Sexual**

Volume 01

BR 00000000/00

**Revisão 03
JUNHO / 2017**



E&P

CONTROLE DE REVISÕES – BR 00000000/00

[illegible]

	Original	Rev. 01	Rev. 02	Rev. 03	Rev. 04	Rev. 05	Rev. 06	Rev. 07	Rev. 08
Data	05/08/2015	30/10/2015	16/03/2016	26/06/2017					
Elaboração	Coletiva	Coletiva	A. Barreto / M. Carrion	A. Barreto / M. Carrion					
Verificação	A. Barreto	A. Barreto	A. Barreto	A. Barreto					
Aprovação	A. Barreto	A. Barreto	A. Barreto	Petrobras					

INDICE GERAL

I - ESCOPO DESTE PROTOCOLO.....	7
II - DETERMINAÇÃO DE IDADE	8
II.1 - Aves Marinhas	8
II.1.1 - Protocolo para determinação de Idade de Aves Marinhas	8
II.2 - Mamíferos Marinhos.....	8
II.2.1 - Seleção do material	9
II.2.2 - Coleta da amostra	11
II.2.3 - Protocolo para Determinação de Idade a partir de dentes de Odontocetos e Pinípedes.....	13
II.3 - Tartarugas Marinhas	22
II.3.1 - Protocolo para Determinação de Idade a Partir do Osso do Úmero/Ossículos Oculares de Tartarugas Marinhas	22
III - IDENTIFICAÇÃO DE SEXO E MATURAÇÃO SEXUAL.....	31
III.1 - Tartarugas marinhas	31
III.2 - Aves	42
III.2.1 - Coleta das amostras	42
III.2.2 - Análise das amostras.....	43
III.3 - Mamíferos marinhos.....	43
IV - REFERÊNCIAS.....	50
V - GLOSSÁRIO	54
VI - ANEXOS	55
VI.1 - Ficha para medição do osso úmero.....	55
VI.2 - Receitas de corantes	56
VI.2.1 - Receita da hematoxilina de Ehrlich.	56
VI.2.2 - Hematoxilina de Harris (Harris, 1900)	56
VI.2.3 - – Eosina	57
VI.3 - Desidratação e Clarificação Do Material.....	57
VI.4 - Coloração e Montagem Das Lâminas.....	57
VII - COLABORADORES.....	60
VIII - EQUIPE TÉCNICA	61

FIGURAS

FIGURA II.2-1 - EAR PLUG DE UMA BALEIA-AZUL CONECTADA A BULA TIMPÂNICA. AS FIGURAS B, C E D MOSTRAM DETALHES DO EAR PLUG. FONTE: MICHELLE BERMAN-KOWALEWSKIC, SANTA BARBARA MUSEUM OF NATURAL HISTORY.	10
FIGURA II.2.2-1 - ANTES DE PASSAR PELO PROCESSO DE MACERAÇÃO NO CASO DE CARÇAÇAS FRESCAS, O CRÂNIO DEVE SER ENVOLVIDO COM REDE DE NYLON E ETIQUETADO. FONTE: PROJETO BOTO-CINZA (IPEC).	12
FIGURA II.2.2-2 - OS DENTES DOS EXEMPLARES DEVEM SER LIMPOS COM ÁGUA COM AUXÍLIO DE UMA ESCOVA DE CERDAS MACIAS PARA NÃO DANIFICAR O MATERIAL. FONTE: REBECA PIRES WANDERLEY (IPEC).	12
FIGURA II.2.3-1 - ESCOLHA DOS MELHORES DENTES PARA SEREM PREPARADOS E ANALISADOS. FONTE: REBECA PIRES WANDERLEY (IPEC).	13
FIGURA II.2.3-2 - DESBASTE DAS LATERAIS DOS DENTES DE S. GUIANENSIS. FONTE: REBECA PIRES WANDERLEY (IPEC).	14
FIGURA II.2.3.4-1 - CORTES SELECIONADOS APÓS PASSAREM PELA COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA DE HARRIS E BORATO DE SÓDIO A 1%, PASSANDO DA COLORAÇÃO ROXA PARA AZUL ESCURO. FONTE: REBECA PIRES WANDERLEY (IPEC).	18
FIGURA II.2.3.5-1 - CORTES SENDO POSICIONADOS NAS LÂMINAS EMBEBIDOS EM GLICERINA 100%. FONTE: REBECA PIRES WANDERLEY (IPEC).	19
FIGURA II.2.3.6-1 - IMAGEM FEITA A PARTIR DE UM FOTO MICROSCÓPIO DA DENTINA DE S. GUIANENSIS NO SENTIDO LABIAL-LINGUAL, APRESENTANDO AS CAMADAS DE CRESCIMENTO. FONTE: REBECA PIRES WANDERLEY (IPEC).	21
FIGURA II.3.1-1 - DEMONSTRAÇÃO DAS MEDIDAS NECESSÁRIAS ANTES DO CORTE DO OSSO. CT: COMPRIMENTO TOTAL; CL: COMPRIMENTO LONGITUDINAL; LP: LARGURA PROXIMAL; LM: LARGURA MÉDIA; LD: LARGURA DISTAL; LPDP: LARGURA PROXIMAL DO DELTO-PECTORAL. FONTE: CAMILA DOMIT – CEM/UFPR.	23
FIGURA II.3.1-2 - CRÂNIO DA TARTARUGA DE COURO (DERMOCHELYS CORIACAE) DEMONSTRANDO O ANEL DE OSSÍCULOS OCULAR POR INTEIRO. FONTE: AVENS ET AL. (2009).	24
FIGURA II.3.1-3 - LOCALIZAÇÃO DO CORTE A SEREM REALIZADOS NO OSSO DO ÚMERO. FONTE: CAMILA DOMIT – CEM/UFPR.	25
FIGURA II.3.1-4 - LOCALIZAÇÃO DO CORTE A SER REALIZADO NOS OSSÍCULOS OCULARES DA TARTARUGA DE COURO. FONTE: ZUG E PARHAM, (1996).	25
FIGURA III.1.1.5.1-1 - GÔNADA DE INDIVÍDUO JUVENIL DE TARTARUGA-VERDE ENCONTRADO ENCALHADO MORTO NO LITORAL DO PARANÁ. FONTE: ROSA (2009).	33
FIGURA III.1.1.5-1 - GÔNADA DE FILHOTE DE CHELONIA MYDAS A: CÉLULAS GERMINATIVAS; B: MÉDULA COM TÚBULOS SEMINÍFEROS; C. TÚNICA ALBUGÍNEA; D. CÓRTEX. FONTE: MILLER E LIMPUS, (2003).	35
FIGURA III.1.1.5-2 - GÔNADA DE MACHO JUVENIL DE CHELONIA MYDAS COM TÚBULOS SEMINÍFEROS APARENTES, AUMENTO DE 5X E CORADO EM H/E. FONTE: MARIANE FERRARINI ANDRADE, LEC/CEM/UFPR.	36
FIGURA III.1.1.5-3 - TESTÍCULO DE ADULTO DE CHELONIA MYDAS A. ESTÁGIO 1; B. ESTÁGIO 2, ESPERMATÓCITOS PRIMÁRIOS E ESPERMATOGÔNIAS; C. ESTÁGIO 4, ESPERMÁTIDES EM TRANSIÇÃO PARA ESPERMATOGÔNIA; D. ESTÁGIO 6, ESPERMATOGÊNESE MÁXIMA. FONTE: MILLER E LIMPUS, (2003).	37

FIGURA III.1.1.5-4 - GÔNADA DE FÊMEA FILHOTE DE CHELONIA MYDAS A. CÉLULAS GERMINATIVAS; B. MEDULA; C. TÚNICA ALBUGÍNEA; D. CÓRTEX. FONTE: MILLER E LIMPUS, (2003).	38
FIGURA III.1.1.5-5 - GÔNADA DE JUVENIL DE CHELONIA MYDAS COM PRESENÇA DE OVÓCITOS COM O CITOPLASMA AUMENTADO, AUMENTO DE 5X E CORADO EM H/E. FONTE: MARIANE FERRARINI ANDRADE, LEC/CEM/UFPR.	39
FIGURA III.1.1.5-6 - OVÁRIO DE CARETTA CARETTA A. FOLÍCULO PRÉ-OVULATÓRIO MADURO; B. FOLÍCULOS PRÉ-VITELOGÊNICOS; C. CORPO LÚTEO; D. CORPO ALBICANS; E. VESÍCULA COM FLUÍDO; F. FOLÍCULO ATRÉSICO. FONTE: MILLER E LIMPUS, (2003).	39
FIGURA III.1.1.6-1 - GÔNADAS GRANULOSAS DE CHELONIA MYDAS JUVENIS. FONTE: THAIS DE S. BARBOSA, BIOPESCA.	41
FIGURA III.1.1.6-2 - GÔNADAS MISTAS DE CHELONIA MYDAS JUVENIS, CONSIDERANDO QUE (A) É A PORÇÃO LISA E (B) PORÇÃO GRANULOSA. FONTE: THAIS DE S. BARBOSA, BIOPESCA.	42
FIGURA III.1.1.6.2-1 - POSIÇÃO DOS TESTÍCULOS DE UM MACHO DE PONTOPORIA BLAINVILLEI. FONTE: CAROLINA P. BERTOZZI, BIOPESCA.	45
FIGURA III.1.1.6.2-2 - POSIÇÃO DOS OVÁRIOS DE UMA FÊMEA DE PONTOPORIA BLAINVILLEI. EM DESTAQUE: OVÁRIO DIREITO E OVÁRIO ESQUERDO CONTENDO CORPO LÚTEO DE GRAVIDEZ. FONTE: CAROLINA P. BERTOZZI, BIOPESCA	45
FIGURA III.1.1.6.2-1 - FOTOMICROGRAFIA DE TESTÍCULO IMATURO DE PONTOPORIA BLAINVILLEI. COLORAÇÃO: HEMATOXILINA E EOSINA. AUMENTO: X 400. ESCALA: 50 µM. FONTE: CAROLINA P. BERTOZZI, BIOPESCA.	47
FIGURA III.1.1.6.2-2 - FOTOMICROGRAFIA DE TESTÍCULO PÚBERE DE PONTOPORIA BLAINVILLEI. COLORAÇÃO: HEMATOXILINA E EOSINA. AUMENTO: X 400. ESCALA: 50 µM. FONTE: CAROLINA P. BERTOZZI, BIOPESCA.	48
FIGURA III.1.1.6.2-3 - FOTOMICROGRAFIA DE TESTÍCULO MADURO DE PONTOPORIA BLAINVILLEI. COLORAÇÃO: HEMATOXILINA E EOSINA. AUMENTO: X 100. ESCALA: 50 µM. FONTE: CAROLINA P. BERTOZZI, BIOPESCA.	48
FIGURA III.1.1.6.2-4 - FOTOMICROGRAFIAS DE OVÁRIO DE PONTOPORIA BLAINVILLEI IMATURA. AUMENTO: X 100. ESCALA: 50 µM. FONTE: CAROLINA P. BERTOZZI, BIOPESCA.	49
FIGURA VI.1-1 – MEDIDAS A SEREM TOMADAS DOS ÚMEROS DE TARTARUGAS MARINHAS: CT: COMPRIMENTO TOTAL; CL: COMPRIMENTO ITLUDINAL; LP: LARGURA PROXIMAL; E: ESPESSURA; LM: LARGURA MÉDIA; LPDP: LARGURA PROXIMAL DO DELTO-PECTORAL; LD: LARGURA DISTAL.....	55

I - ESCOPO DESTES PROTOCOLO

Este documento tem como finalidade orientar os participantes do Projeto de Monitoramento de Praia da Bacia de Santos (PMP-BS) no desenvolvimento das atividades previstas no projeto executivo do mesmo. O Projeto Executivo do Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS) foi elaborado considerando as orientações contidas no Termo de Referência CGPEG/DILIC/IBAMA Nº 002/13 - “Termo de Referência para Elaboração do Estudo de Impacto Ambiental – EIA e Respectivo Relatório de Impacto Ambiental - RIMA para a Produção e Escoamento de Petróleo e Gás Natural do Polo Pré-Sal da Bacia de Santos – Etapa 2” e nos Pareceres Técnicos Nº 122/2014 e 343/2014.

As equipes que executam as atividades devem seguir os procedimentos aqui descritos para garantir a qualidade e homogeneidade das informações coletadas, e assim permitir análises integradas confiáveis.

A elaboração deste protocolo foi um esforço colaborativo dos diversos pesquisadores envolvidos no PMP-BS, além de especialistas externos convidados a contribuir em áreas específicas. A listagem completa dos pesquisadores que contribuíram com este protocolo se encontra no final do documento.

Este documento não deve ser utilizado em atividades alheias ao PMP-BS, uma vez que foi concebido com foco nas especificidades deste projeto. O uso deste documento como fonte de referência para trabalhos acadêmicos deve ser evitado e recomenda-se que sejam utilizadas as fontes de referência indicadas.

II - DETERMINAÇÃO DE IDADE

Antes de se conduzir as etapas laboratoriais, o material biológico que será utilizado deverá ser coletado em campo por meio do monitoramento de praias. Ao se encontrar quelônios, aves e mamíferos marinhos mortos em praias, os materiais biológicos específicos descritos a seguir serão coletados:

II.1 - Aves Marinhas

Devido à ausência de estruturas que permitam uma determinação de idades absolutas, para as aves serão utilizadas somente determinações relativas.

II.1.1 -Protocolo para determinação de Idade de Aves Marinhas

Será analisado o padrão de coloração da plumagem. Para tanto será realizada análise manual das penas do corpo, das rémiges e retrizes e, posteriormente serão também fotografadas. Sendo também avaliada quanto a presença de muda e coloração das patas e bicos.

Para espécimes que sejam necropsiados e não seja possível avaliar a plumagem, a observação da presença da Bursa de Fabricius pode ser utilizada para indicar o estágio juvenil.

Por último, a pneumatização craniana, que é a deposição gradual da segunda camada de osso no crânio – é outro critério, desta vez anatômico, para definir a idade de aves, sendo que existem dois padrões: o periférico (ossificação a partir das bordas do crânio até o meio) e o da linha mediana (ossificação de uma linha mediana e das bordas, simultaneamente). Este processo pode levar de quatro a doze meses e separa as aves jovens das adultas (PODULKA et al. 2004).

II.2 -Mamíferos Marinhos

Para esta etapa será necessário estar munido de EPI, bisturis, facões, alicate se necessário, potes de plástico de 100ml a 500ml para armazenagem do material a ser coletado.

II.2.1 -Seleção do material

No caso de pinípedes e cetáceos odontocetos, os dentes são fundamentais para serem coletados para a determinação de idade. Para os cetáceos mysticetos, é recomendado coletar, quando possível, a parte terminal da bula timpânica conhecida como "ear plug" (Figura II.2-1). Para histórico e detalhes das metodologias aqui apresentadas recomenda-se ver Perrin e Myrick (1980) e Hohn et al. (1989).

Apesar de ainda não se dispor de estrutura laboratorial e de experiência específica em datação de idade em mysticetos no Brasil, fica recomendada a coleta das bulas timpânicas sempre que possível para futuramente se determinar as idades dos exemplares coletados. A grande barreira ficaria restrita ao acesso ao crânio para a coleta do material biológico. Muitas vezes os cetáceos de grande porte encalham em áreas densamente povoadas, havendo recomendação expressa de prefeituras municipais de se limpar o mais rapidamente possível a praia. Em muitas ocasiões escavadeiras enterram os exemplares na praia onde apareceram, ou caminhões de limpeza transportam a carcaça ao lixo municipal mais próximo.

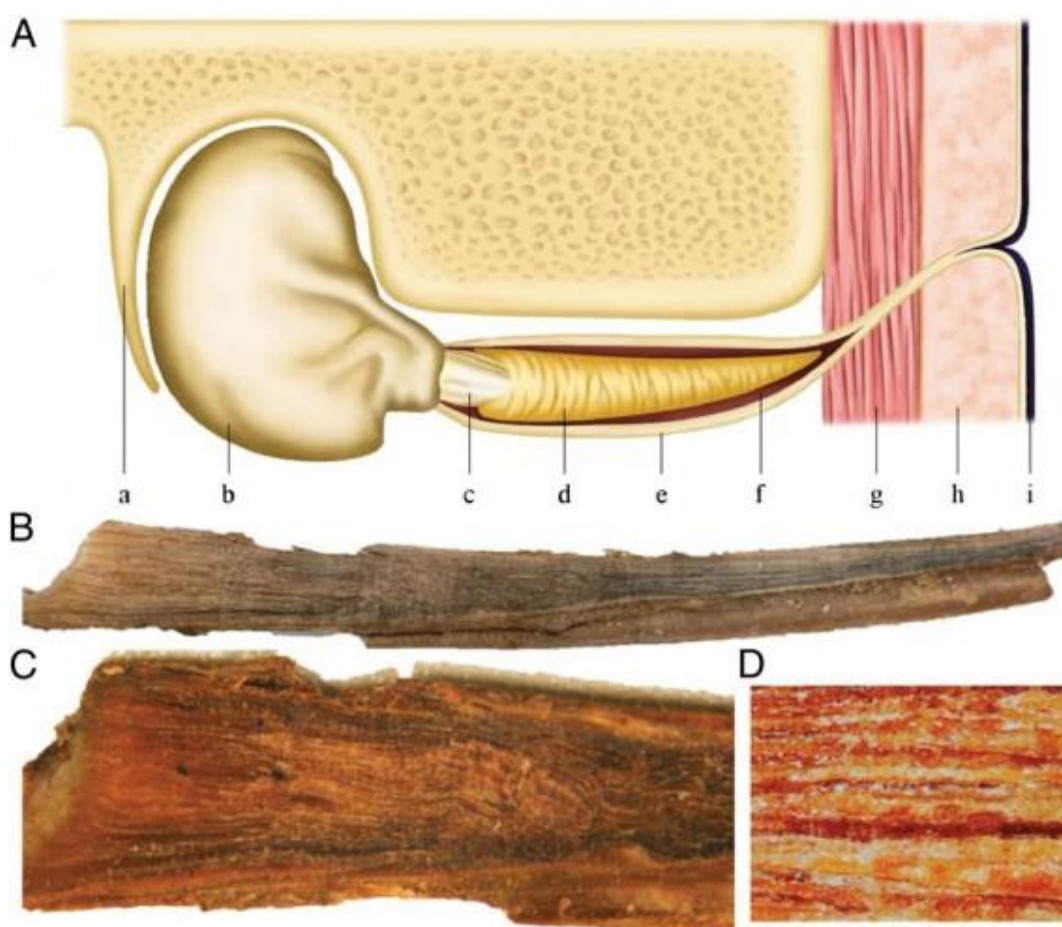


Figura II.2-1- Ear plug de uma baleia-azul conectada a bula timpânica. As figuras B, C e D mostram detalhes do ear plug. Fonte: Michelle Berman-Kowalewskic, Santa Barbara Museum of Natural History.

A escolha dos dentes pode variar quando se compararam diferentes espécies. Para os odontocetos, aparentemente não há uma preferência por um ou mais dentes em particular, apesar de parte da literatura existente recomendar os dentes medianos da mandíbula ("lower jaw", em língua inglesa). De preferência eles devem estar inteiros e apresentarem a estrutura menos curvada possível. Há exceção no caso de cachalotes, que os primeiros dentes mandibulares são os mais indicados para determinação de idade. Caso estes estejam demasiadamente gastos pelo uso e pela idade, qualquer dente reto e não exposto da maxila ("upper jaw", em língua inglesa). No caso de baleias-bicudas (família Ziphiidae) que geralmente apresentam um ou poucos pares de dentes, é recomendável recuperar o maior número possível de dentes encontrados. Para

os pinípedes, caninos e pós-caninos têm sido utilizados, com maior utilização dos dentes caninos.

II.2.2 -Coleta da amostra

Os dentes dos exemplares devem ser extraídos, e os tecidos externos e internos à cavidade pulpar devem ser limpos com água e com o auxílio de uma escova de cerdas macias para não danificar o material. No caso de carcaça fresca o crânio (Figura II.2.2-1) deve passar pelo processo de maceração para que os dentes sejam retirados com facilidade, pois em casos em que os dentes estão firmemente presos na arcada dentária, corre-se o risco de riscar e/ou quebrar os dentes na tentativa de retirá-los. Para o processo de maceração o crânio devidamente identificado deve ser imerso num tanque com água e envolvido em tela de nylon ou similar para que os dentes não se percam.

Quando o estado de decomposição está mais avançado, geralmente os dentes se soltam mais facilmente. Caso no momento da coleta do animal os dentes não estejam mais aderidos ao crânio (espalhados na areia, por exemplo), os dentes devem ser recolhidos e armazenados em saco plástico individual, identificados com o mesmo número de registro do animal em si.

Após a lavagem (Figura II.2.2-2), os dentes devem ser secos naturalmente e armazenados em solução de glicerina e etanol (1:1), que costuma ser conveniente para acondicionamento de material a ser analisado em longo prazo. Mesmo sem essas recomendações, dentes coletados há mais de um século e armazenados em museus a seco foram utilizados não somente para a determinação de idade, mas também para estudos envolvendo a determinação da composição isotópica de C e N dos indivíduos amostrados. Para facilitar o transporte e evitar vazamento de líquidos, sugere-se armazenar a seco para o transporte e, em laboratório, serem armazenados na solução citada.

Caso seja possível coletar bulas timpânicas de mysticetos e os *ear plugs*, é recomendado guardar as bulas a seco e os *ear plugs* em solução de formaldeído a 10%. Em função das limitações anteriormente descritas, não serão descritas as etapas de preparação dos *ear plugs* para determinação de idade em mysticetos.



Figura II.2.2-1 - Antes de passar pelo processo de maceração no caso de carcaças frescas, o crânio deve ser envolvido com rede de nylon e etiquetado. Fonte: Projeto Boto-cinza (IPeC).



Figura II.2.2-2 - Os dentes dos exemplares devem ser limpos com água com auxílio de uma escova de cerdas macias para não danificar o material. Fonte: Rebeca Pires Wanderley (IPeC).

II.2.3 -Protocolo para Determinação de Idade a partir de dentes de Odontocetos e Pinípedes

Para a escolha dos melhores dentes deve-se levar em consideração a forma e o tamanho das amostras (Figura II.2.3-1). Os dentes considerados ideais são os maiores, menos curvados e menos desgastados, pois as camadas de crescimento estão mais visíveis e facilitam a leitura da idade. Nesta etapa é muito importante que haja uma seleção rigorosa dos dentes, pois aqueles que por ventura estiverem muito desgastados, tanto em relação à extremidade superior quanto às laterais da dentina e cemento certamente serão difíceis de serem preparados e/ou analisados. Geralmente os maiores dentes estão localizados na porção mediana da mandíbula direita ou esquerda.



Figura II.2.3-1 - Escolha dos melhores dentes para serem preparados e analisados.

Fonte: Rebeca Pires Wanderley (IPeC).

Os dentes escolhidos devem ter suas laterais desbastadas no sentido labial-lingual ou antero-posterior (de acordo com cada espécie) em uma serra diamantada (Figura II.2.3-2). No caso de *Sotalia guianensis* (boto-cinza) o sentido labial-lingual é o mais indicado, já para *Pontoporia blainvillei* (toninha) o melhor sentido é antero-posterior. Para espécies de cetáceos e pinípedes que não possuem indicação descrita, devem ser testados os dois sentidos para determinar o mais adequado para cada espécie. Este desbaste facilita a penetração do ácido descalcificador na próxima etapa. Os dentes que apresentarem cavidade pulpar aberta, geralmente de filhotes e indivíduos jovens não necessitam ter suas laterais desbastadas, pois a cavidade pulpar aberta permite que o ácido penetre com facilidade atuando nas partes interna e externa ao mesmo tempo. Além

disso, os dentes com cavidade pulpar aberta são mais frágeis e correm o risco de quebrar no momento do desbaste. Portanto, devem ser submetidos a este processo apenas os dentes de indivíduos mais velhos, que possuam a cavidade pulpar quase fechada ou fechada completamente.

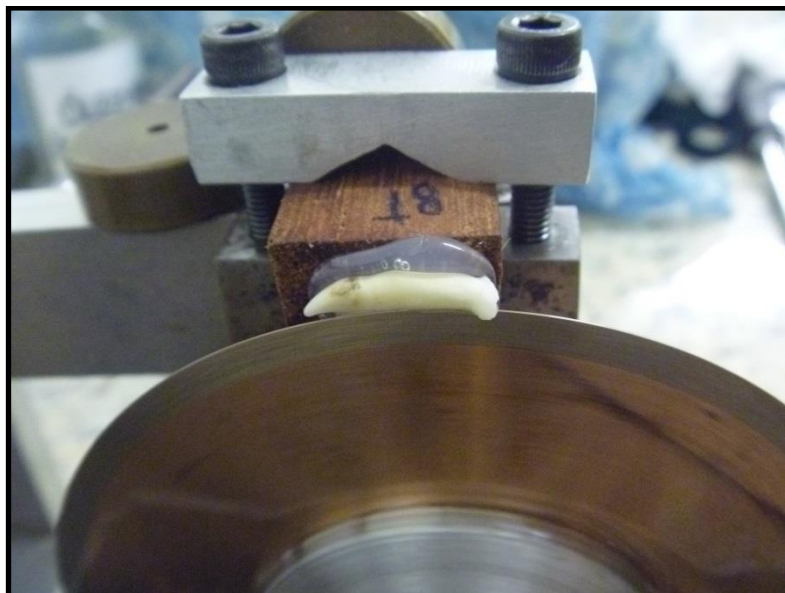


Figura II.2.3-2 - Desbaste das laterais dos dentes de *S. guianensis*. Fonte: Rebeca Pires Wanderley (IPeC).

II.2.3.1 - Lixamento e Polimento

Antes da descalcificação dos dentes é necessário lixar e polir a superfície das amostras desbastadas para que haja a eliminação de ranhuras após o desbaste. Deve-se utilizar lixas d'água de granulações decrescentes (nº 320, 400 e 600) para lixar e após este processo utilizar tecido acrílico, saponáceo em pó ou em pasta e água em abundância para polir. A superfície de cada dente deve ser examinada sob uma lupa para verificar as ranhuras foram totalmente eliminadas.

II.2.3.2 -Descalcificação

Após o polimento os dentes devem ser colocados em recipientes plásticos fechados e com furos, imersos em formol a 10% de 12 às 72h e depois lavados em água corrente (Figura II.2.3.2-). Após este processo os dentes devem ser

inseridos em RDO®, um descalcificador comercial de ossos de ação rápida, a base de ácido clorídrico (Figura II.2.3.2-). Outros ácidos como o ácido fórmico e o ácido nítrico também são utilizados para descalcificar os dentes.

O tempo de descalcificação varia para cada espécie. Ex: Para *S. guianensis* o tempo pode variar de 1 a 5 horas para infantes e indivíduos jovens e de 5 a 20 horas para indivíduos mais velhos. Para *P. blainvillei* o tempo de descalcificação pode variar de 30 minutos para recém-nascidos, até 6 horas para indivíduos velhos. Para *Physeter macrocephalus* (cachalote) os dentes podem permanecer até 40 horas em ácido fórmico 5%. Ao longo deste processo os dentes devem ser observados a cada meia hora para a avaliação do efeito de descalcificação. É muito importante o monitoramento dos dentes nesta etapa, pois a ação do RDO® é muito rápida e há grandes chances de perda de material. O dente é considerado completamente descalcificado quando se apresenta flexível em toda a sua extensão. Após a descalcificação total dos dentes, eles devem ser inseridos em água corrente por aproximadamente 10 horas para que o RDO® seja completamente removido e não comprometer a amostra.

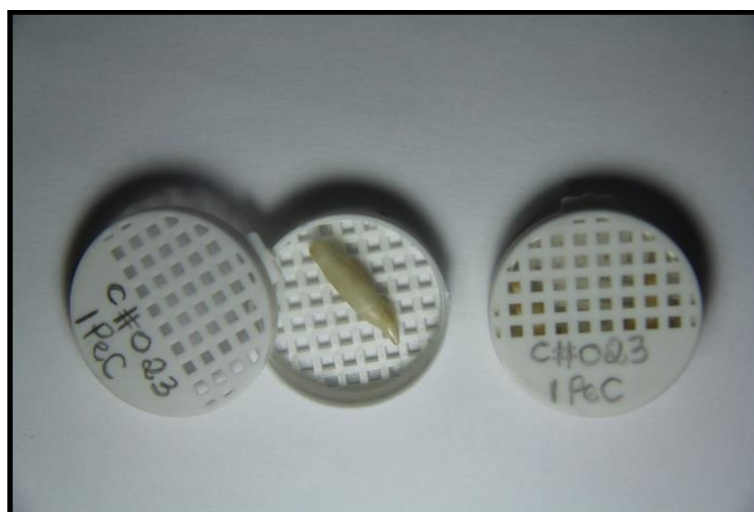


Figura II.2.3.2-1 - Os dentes devem ser colocados em recipientes fechados e com furos devidamente identificados e inseridos em formol a 10%. Fonte: Rebeca Pires Wanderley (IPeC).

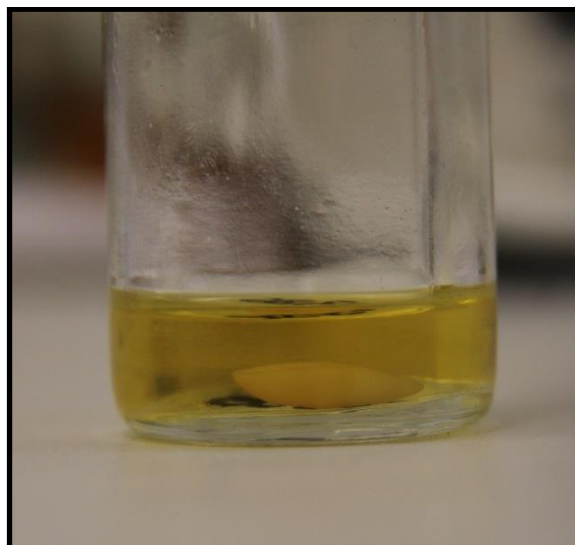


Figura II.2.3.2-2 - Dentes de *S. guianensis* inseridos em RDO®. Fonte: Rebeca Pires Wanderley (IPeC).

II.2.3.3 - Corte em seções finas

Após a descalcificação, deve-se adicionar uma gota de gel de congelamento para corte de tecidos na plataforma de corte do micrótomo de congelamento. Um dente deve ser posicionado sobre a gota, deitado com o eixo longitudinal horizontal à plataforma do micrótomo, no sentido indicado para cada espécie (antero-posterior ou labial-lingual) (Figura II.2.3.3-). Com o dente devidamente posicionado na plataforma, deve-se ligar o CO₂ para o congelamento total da amostra. A espessura do corte varia para cada espécie. Para *S. guianensis* e *P. blainvillei* os cortes podem variar entre 25 µm e 35 µm, para *Stenella spp.* de 20µm a 40µm e para *Tursiops truncatus* (golfinho-nariz-de-garrafa) de 40µm a 50µm.

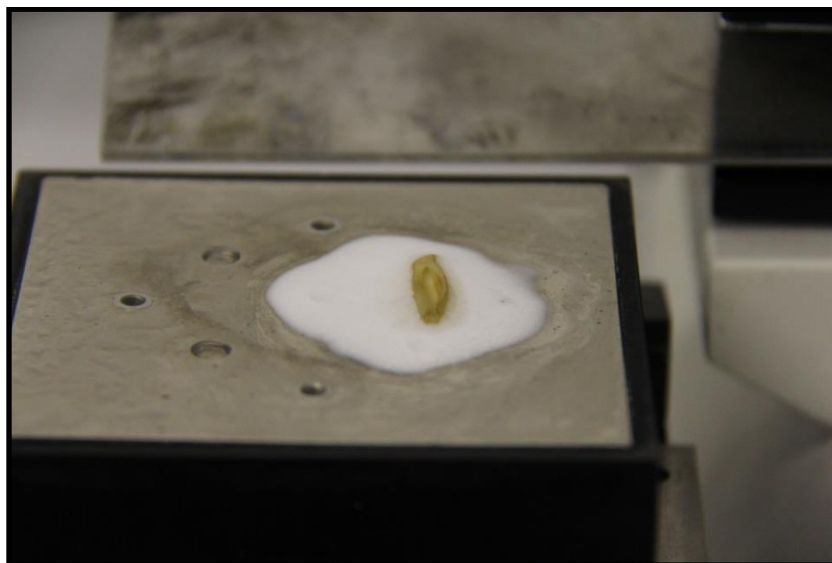


Figura II.2.3.3-1 - Dente inserido na gota de gel de congelamento na base do micrótomo antes de ser congelado completamente. Fonte: Rebeca Pires Wanderley (IPeC).

Com a ajuda de um pincel de cerdas finas deve-se retirar os cortes da lâmina e inseri-los em um recipiente com água (Figura II.2.3.3-). Devem ser escolhidos os cortes mais centrais de cada dente, onde as camadas de crescimento são mais bem visualizadas. O restante pode ser descartado.



Figura II.2.3.3-2 - Cortes em sessões finas inseridos em um recipiente com água. Fonte: Rebeca Pires Wanderley (IPeC).

II.2.3.4 - Coloração e fixação

Os cortes selecionados devem ser corados em Hematoxilina de Harris por 5 minutos e posteriormente inseridos em água corrente por 10 minutos para a retirada do excesso de corante (Figura II.2.3.4-1). Nesta fase, os cortes passam a apresentar coloração roxa. Para a fixação da coloração, devem ser inseridos em uma solução aquosa contendo Borato de Sódio a 1% por aproximadamente 1 minuto ou até que passem a apresentar coloração azul escuro. Novamente estes devem ser inseridos em água corrente para a retirada do excesso de Borato de Sódio.



Figura II.2.3.4-1 - Cortes selecionados após passarem pela coloração com Hematoxilina de Harris e Borato de Sódio a 1%, passando da coloração roxa para azul escuro. Fonte: Rebeca Pires Wanderley (IPeC).

II.2.3.5 - Preparação das lâminas

Para a preparação das lâminas os cortes devem ser inseridos em glicerina 50%, 75% e 100% respectivamente, durante 10 minutos em cada concentração (Figura II.2.3.5-1). Este processo gradativo é importante para que não ocorra uma

desidratação brusca do material, o que pode causar enrugamentos no tecido. Após esta etapa, os cortes devem ser posicionados nas lâminas, embebidos em glicerina 100% e as lamínulas devem ser colocadas por cima sempre iniciando de um dos lados para o outro, tendo-se o cuidado para que bolhas de oxigênio não se formem e não comprometam a durabilidade da coloração nos tecidos. Elas devem ser coladas com Entellan® com o auxílio de algum material de ponta fina. Pode-se repetir o processo de inserir entellan ao redor da lamínula mais de uma vez em intervalos de algumas horas para garantir que a vedação seja feita totalmente. Foi observado que com o tempo que alguns cortes inseridos nas lamínulas podem perder a coloração azul escura. Isso pode estar relacionado com a vedação correta das lamínulas.

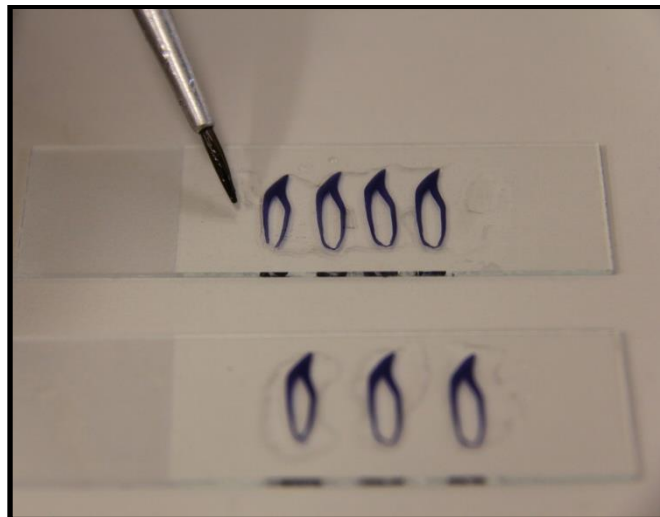


Figura II.2.3.5-1 - Cortes sendo posicionados nas lâminas embebidos em glicerina 100%. Fonte: Rebeca Pires Wanderley (IPeC).

II.2.3.6 - Leitura das camadas de crescimento (GLG's)

As lâminas devem ser utilizadas para a leitura da idade a partir da contagem das camadas de crescimento presentes na dentina e no cemento dos dentes (Figura II.2.3.6-1). Com o intuito de realizar a contagem das camadas de crescimento com mais precisão, é ideal que o material contido nas lâminas seja fotografado em um microscópio em 40X e 100X.

A dentina fetal apresenta uma camada uniforme e levemente corada, já a linha neonatal apresenta uma linha fina e fortemente corada. Após a linha neonatal na dentina segue-se as GLG's (camadas de crescimento) formadas cada uma por uma camada fina clara (pouco corada) e outra camada larga escura (fortemente corada). Entre duas camadas de crescimento é possível notar uma linha muito fina fortemente corada. No cemento esse padrão de coloração se inverte (camada fina corada e camada larga não corada). Geralmente as duas primeiras camadas não são tão conspícuas. Entre a linha neonatal e o fim da primeira camada é observada uma camada acessória que indica o fim do período de lactação dos indivíduos.

A leitura da idade de cada exemplar deve ser realizada pelo menos três vezes por ao menos dois observadores com intervalo de três a dez dias entre cada leitura. No momento de cada leitura não se deve ter acesso às idades determinadas anteriormente para que não haja qualquer tipo de influência. Pode-se utilizar um microscópio óptico quando houver dúvidas sobre a idade de alguns exemplares, onde é possível observar toda a extensão dos cortes dentários nas lâminas. A idade final deve ser determinada a partir da terceira leitura, pois a habilidade de leitura é adquirida com o passar do tempo, obtendo-se idades estimadas com maior acuidade.

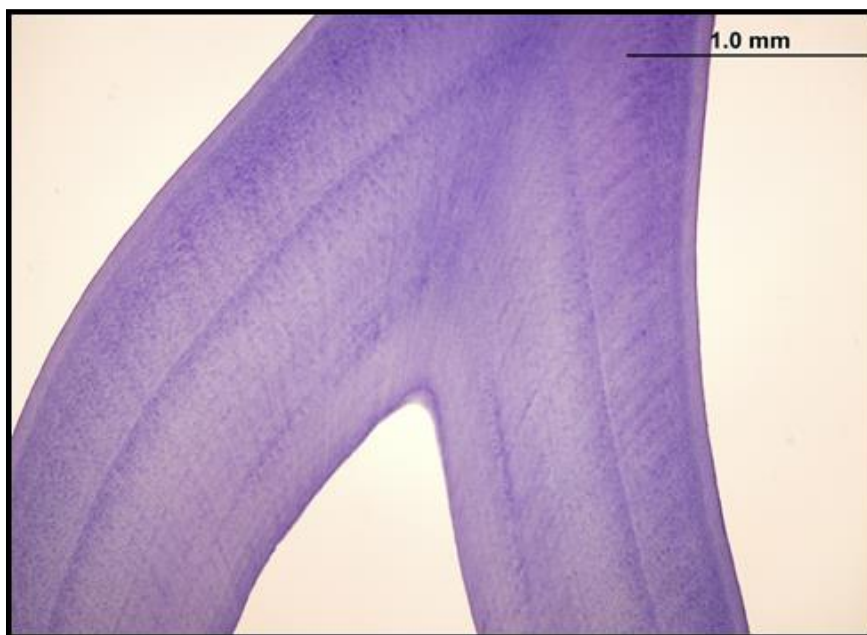


Figura II.2.3.6-1- Imagem feita a partir de um foto microscópio da dentina de *S. guianensis* no sentido labial-lingual, apresentando as camadas de crescimento. Fonte: Rebeca Pires Wanderley (IPeC).

II.3 - Tartarugas Marinhas

Dentre as espécies de tartarugas marinhas, é utilizado o osso do úmero para tartaruga-de-pente (*Eretmochelys imbricata*), tartaruga-verde (*Chelonia mydas*), tartaruga-cabeçuda (*Caretta caretta*) e tartaruga-oliva (*Lepidochelys olivacea*). Já para a tartaruga-de-couro (*Dermochelys coriacea*) são utilizados os ossículos oculares já que o osso do úmero desta espécie tem uma alta taxa de reabsorção óssea.

Durante o monitoramento de praia, ao encontrar um espécime de tartaruga marinha, independente do estágio de decomposição, coletar as duas nadadeiras anteriores que contêm o osso do úmero. Já para a coleta dos ossículos oculares é necessário a coleta dos olhos em perfeito estado, ou seja, a tartaruga deve estar fresca para a coleta ser viável. Ao mesmo tempo da coleta do úmero e dos olhos, coletar outros dados quando possível:

- Espécie
- Tamanho curvilíneo ou retilíneo da carapaça (CCC ou CRC)
- Largura curvilínea ou retilínea da carapaça (LCC ou LRC)
- Presença de tumores
- Gênero

II.3.1 -Protocolo para Determinação de Idade a Partir do Osso do Úmero/Ossículos Oculares de Tartarugas Marinhas

As técnicas aqui apresentadas estão baseadas em Zug *et al.* (1986) e Avens *et al.* (2009). Para detalhes da técnica recomenda-se ver as publicações originais.

II.3.1.1 - Limpeza dos ossos

As nadadeiras e/ou olhos devidamente identificados devem ser descongelados, dissecados até que o máximo de tecido mole seja retirado.

Os úmeros e ossículos oculares dissecados devem ser colocados em sacos de nylon (tipo rede), identificados e lacrados com linha de nylon.

Cada saco conterá 1 e/ou 2 ossos ou o conjunto de ossículos oculares do mesmo animal e serão colocados dentro de uma caixa com água por aproximadamente 2 semanas.

Após este tempo, os ossos devem ser lavados com água e colocados para secar por mais duas semanas.

Quando secos, devem ser identificados com dados de número de tombo e espécie e acondicionados em caixas.

II.3.1.2 - Seleção e mensuração dos ossos

Escolher 10 ossos pequenos ou 5 ossos grandes para processar, tendo estes aproximadamente o mesmo tamanho.

Os úmeros serão mensurados usando paquímetro digital ou analógico e um formulário de medidas preenchidos (Figura II.3.1-1). Quanto aos ossículos, não é necessário a realização de medidas, porém antes do corte deve-se fotografar como na Figura II.3.1-2.

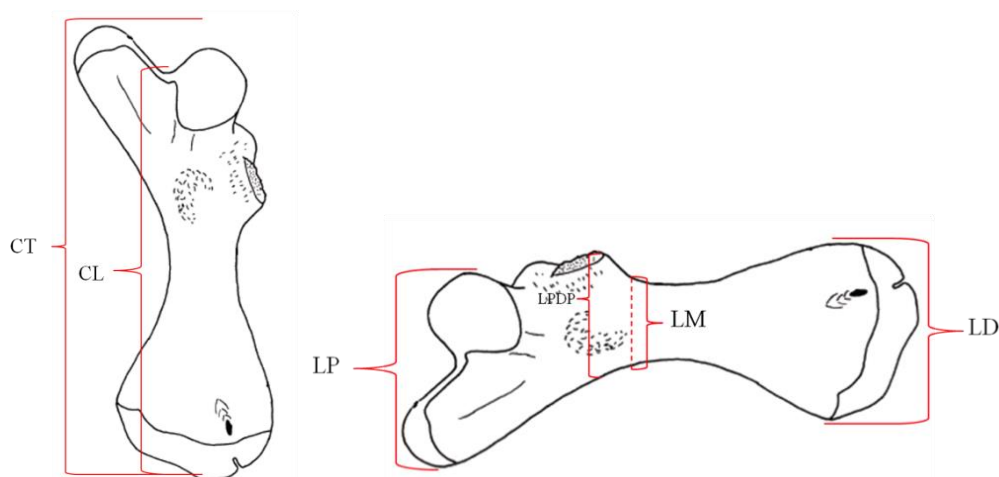


Figura II.3.1-1 - Demonstração das medidas necessárias antes do corte do osso. CT: comprimento total; CL: comprimento longitudinal; LP: largura proximal; LM: largura média; LD: largura distal; LPDP: largura proximal do delto-pectoral. Fonte: Camila Domit – CEM/UFPR

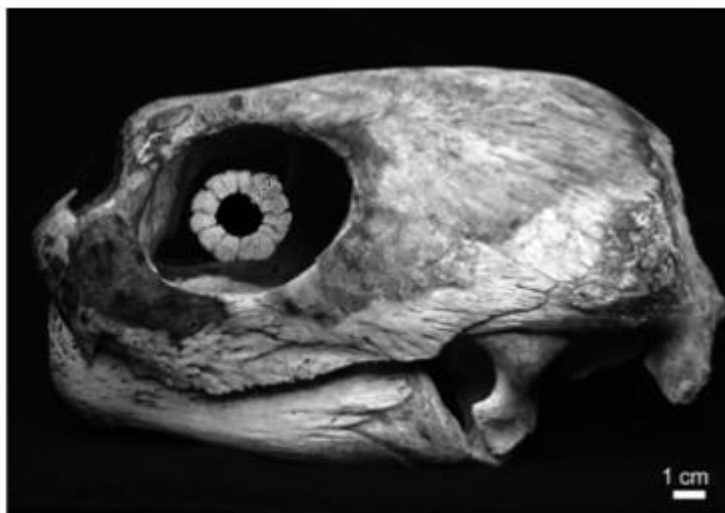


Figura II.3.1-2 - Crânio da tartaruga de couro (*Dermochelys coriaca*) demonstrando o anel de ossículos ocular por inteiro. Fonte: Avens et al. (2009).

II.3.1.3 - Corte na serra metalográfica

Cortar a parte distal dos ossos se não forem pequenos o bastante para caber na serra.

Colocar a lâmina na serra.

Colocar água com sabão no container embaixo da lâmina.

Marcar, com um lápis, no osso o local do corte. Cortar próximo à cicatriz de inserção do músculo do osso (Figura II.3.1-3) . Já nos ossículos, como indicado na Figura II.3.1-4.

Lembrar que pedaços do osso serão perdidos no processo de corte, então deve-se deixar um espaço suficiente.

Colocar o osso na serra com a extremidade voltada para baixo para que a água possa escorrer.

Fazer cortes de 2 a 3 mm de espessura perto da cicatriz de inserção do músculo .

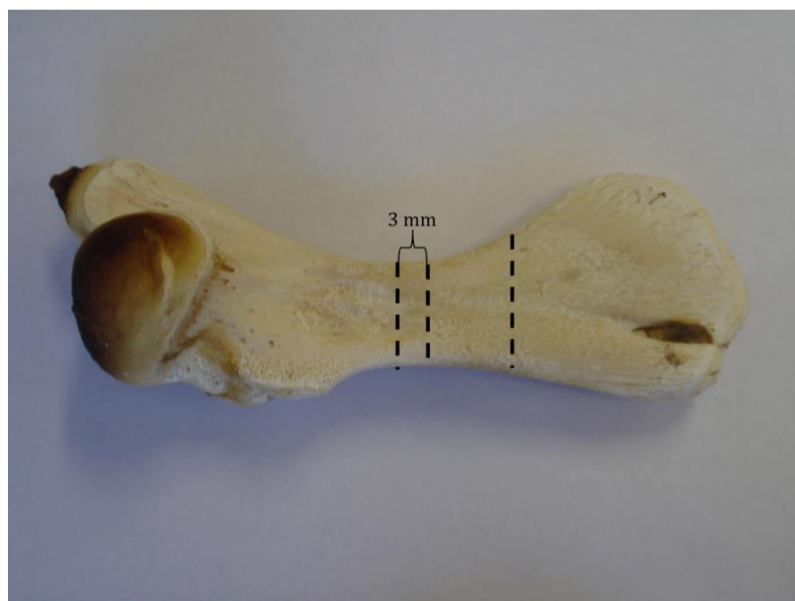


Figura II.3.1-3 - Localização do corte a serem realizados no osso do úmero. Fonte: Camila Domit – CEM/UFPR

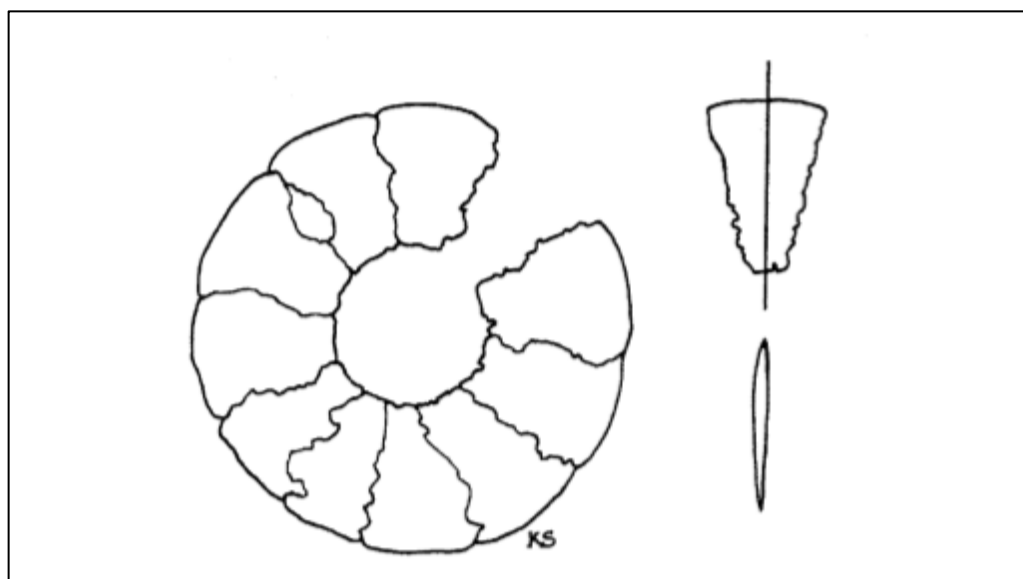


Figura II.3.1-4 - Localização do corte a ser realizado nos ossículos oculares da tartaruga de couro. Fonte: Zug e Parham, (1996).

II.3.1.4 - Descalcificação

Os cortes devem ser colocados nos histo-cassetes, identificados com etiquetas pequenas.

Colocar os histo-cassetes em formol a 10% por 2-3 horas para fixação. Enxaguar bem e deixar os histo-cassetes de 5-10 min em água.

Após o enxague, colocar os histo-cassetes no RDO (descalcificador comercial) e deixar no mínimo 4 horas. Como não existe um padrão de tempo para o RDO, a partir de 4 horas no descalcificador, é necessário realizar testes para avaliar a descalcificação, que, estará completa quando o osso estiver com consistência de borracha. Após o RDO, lavar com água os ossos nos histo-cassetes, secar e colocar em um becker com água destilada durante uma noite.

II.3.1.5 - Corte em micrótomo

Ajustar o local aonde o osso será colocado, se necessário.

Colocar o gel de congelamento (*OCT compound®*) no local, o suficiente para que o osso seja envolvido por completo.

Secar o osso e colocar no local.

Tornar o local para a temperatura -10.5°C para congelar, até que o gel se torne esbranquiçado.

Colocar a navalha no micrótomo acima do nível do osso. Ajuste quando necessário.

Quando estiver congelado, diminua para -2.5°C e espere alguns minutos.

Enquanto aguarda: pegar duas placas de petri, um becker com água, 1 recipiente com glicerina a 100%, e identificá-los externamente na lateral e na tampa e com uma etiqueta dentro do pote.

Após congelar o osso, colocar a lâmina no nível deste.

Realizar cortes com espessuras de 25 - 30 μm do osso e retirar as secções com o auxílio de um pincel.

As secções devem ser colocadas em placa de petri com água destilada. Selecionar e colocar as secções completas em outra placa de petri com água para analisar sob microscópio estereoscópico (lupa) para verificar se estão completas.

Selecionar 10 secções inteiras.

Desligar o micrótomo e esperar que descongele, antes que derreta totalmente, tirar o gel de congelamento junto com o osso e colocar em becker com água destilada.

Colocar o fragmento restante do osso em recipiente com glicerina a 50% por 15-20 min., depois transferi-lo para outro em glicerina a 100% e então, para o recipiente já identificado.

Colocar as secções do osso em histo-cassetes identificados e, em um recipiente com água destilada durante uma noite.

II.3.1.6 -Coloração

O corante deve ser feito 1 semana antes de usar (usar a receita para hematoxilina de Ehrlich, Anexo VI.2.1 -).

Diluir o corante com 50% de água destilada assim que for usar. Diluir volume de corante suficiente para os ossos que estão sendo processados.

Colocar os histo-cassetes no corante e colocar no agitador durante 8-10 min.

Tirar do corante e colocar em recipiente com água destilada para retirar o excesso de hematoxilina.

Tirar da água e observar sob microscópio estereoscópico (lupa) a coloração e se é possível observar as linhas de crescimento.

Se a coloração for satisfatória, continuar com os demais cortes.

Depois da coloração, colocar as secções em um recipiente com água destilada por 20 min.

Colocar os histo-cassetes em glicerina a 50% por 20 min.

Deixar escorrer em placas de petri.

Após, colocar por mais 20 min. em glicerina a 100%.

Remover as secções dos histo-cassetes e colocar em reservatório identificado com glicerina a 100%.

II.3.1.7 - Montando as lâminas

Colocar as secções em placa de petri com glicerina a 100%.

Escolher a melhor secção, inteira com toda margem, linhas bem visíveis que parecem estar inteiras.

Pegue uma lâmina limpa, identifique.

Coloque a secção escolhida com um pouco de glicerina.

Coloque a lâmina sob microscópio para ver se está satisfatória, sem presença de partículas externas ou bolhas.

Cubra toda a secção com lamínula.

Deixe as lâminas secando por uma noite.

Após, limpe o excesso de glicerina. Sele a lamínula com cytoseal ou esmalte transparente, verificando que está vedada e não encobriu o osso.

Deixe por mais uma noite.

Obs.: Não se deve montar lâminas se a leitura não for realizada brevemente, pois as secções perdem a coloração, fazendo com que a leitura seja impossível de ser realizada. Se isso acontecer, é necessário que a secção seja limpa e o processo de coloração reiniciado.

II.3.1.8 - Fotos

Para contagem das linhas de crescimento é necessário tirar fotos de pequenas porções da lâmina no microscópio ótico com alta resolução, em seguida juntar essas fotos em algum software de edição de fotografias (Figura II.3.1 - 5).

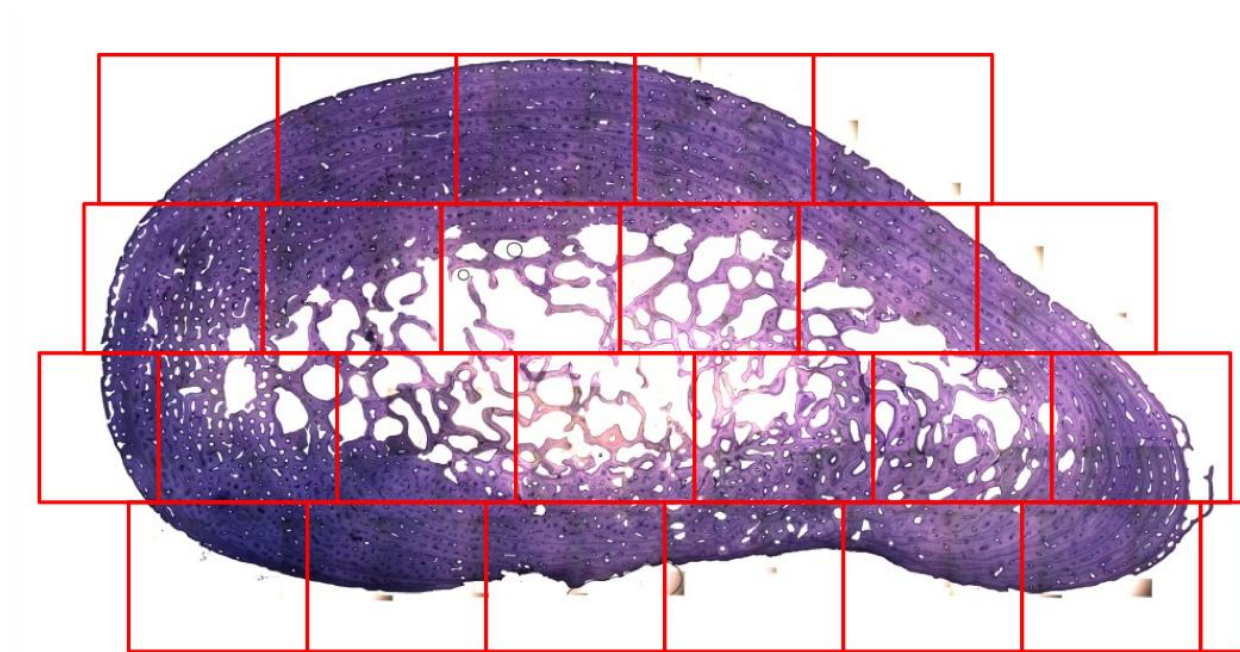


Figura II.3.1-5 - Quadrados vermelhos indicando fotos de pequenas porções da lâmina montada com a secção do osso úmero. Fonte: Camila Domit – CEM/UFPR

II.3.1.9 - Interpretação das linhas de crescimento

O princípio básico desse método é que o crescimento do osso é cíclico e tem uma periodicidade anual em que a formação óssea cessa ou retarda antes de uma nova formação (Snover e Hohn 2004) e, em animais mais velhos, as marcas de crescimento são acumuladas na periferia do osso como resultado de crescimento mais lento (Snover e Hohn 2004). A primeira linha de crescimento (annulus; Figura II.3.1-6) em tartarugas marinhas é depositada diante do centro do osso, enquanto que as linhas de crescimento mais recente ocorrem ao longo da circunferência periférica (Zug et al. 1986). As tartarugas marinhas podem reter ou não a primeira linha de crescimento, pois esta primeira linha e linhas mais antigas são perdidas devido à reabsorção óssea durante o crescimento (Zug et al. 1986).

Para tartarugas que não retiveram a primeira linha de crescimento, serão calculadas as linhas perdidas baseado no fator de correção proposto por Parham e Zug (1997). Portanto, partindo de que uma linha de crescimento corresponde a um ano (Snover e Hohn 2004), as tartarugas que retiverem a annulus, a idade será equivalente ao número de linhas de crescimento observadas. Para as tartarugas sem a annulus, a idade será equivalente ao número de linhas de crescimento observadas adicionada ao número de linhas perdidas.

A interpretação das linhas de crescimento deve ser feita por dois pesquisadores ou por um pesquisador, sendo necessárias três leituras em momentos diferentes, isso para diminuir o erro. Essa interpretação deve ser feita baseada em Castanet (1990) e Snover e Hohn (2004), pois o úmero e ossículos oculares podem apresentar “split lines” e linhas duplas.

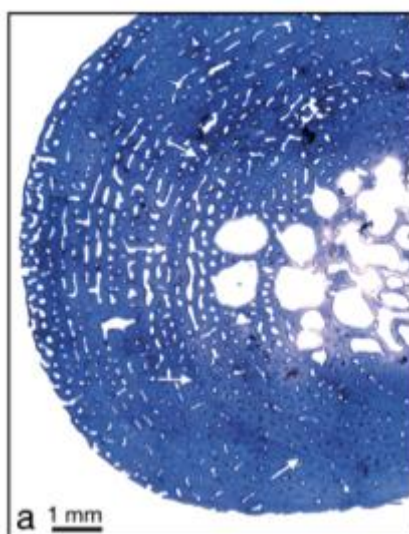


Figura II.3.1-6 - Interpretação das linhas de crescimento (setas) do úmero da tartaruga cabeçuda (*Caretta caretta*): (A) linha dupla, contado como uma linha. Fonte: Camila Domit – CEM/UFPR

III - IDENTIFICAÇÃO DE SEXO E MATURAÇÃO SEXUAL

III.1 - *Tartarugas marinhas*

Material necessário:

- Processador automático de tecidos sistema fechado
- Moldes de aço inoxidável para inclusão em parafina
- Dispensador automático de parafina com placa de resfriamento
- Micrótomo rotativo automático
- Banho Maria
- Corador automático de tecidos
- Microscópio óptico com câmara acoplada
- Estufa de esterilização
- Balança semi-analítica (0,01g)
- Pinça
- Tesoura
- Béquer
- Cassetes plásticos para processamento histológico
- Suporte para lâminas
- Laminário
- Capela de exaustão de gases
- Timer digital 4 canais
- Agitador magnético
- Funil de vidro
- Suporte para funil
- Bastão de vidro

Reagentes:

- Álcool etílico absoluto
- Álcool 70%
- Xilol P.A
- Formaldeído 37% (P.A)
- Eosina amarelada

- Hematoxilina pó
- Óxido de mercúrio
- Alúmen de potássio ou de amônio
- Entellan
- Gelatina histológica
- Parafina histológica
- Navalha *low-profile*
- Pincel
- Lâminas histológicas com extremidade fosca
- Lâminula
- Óleo de imersão para microscópio óptico
- Gaze
- Cuba com gelo
- Papel filtro

III.1.1.1 - Coleta e preparação da amostra

Retirar as gônadas direita e esquerda dos indivíduos em estágio 1 e 2 de decomposição (Figura III.1.1.5.1-1).

Durante a remoção do órgão este não deve ser comprimido para que não haja distorção da estrutura tecidual, sendo aconselhada a remoção do tecido no entorno e até mesmo de uma pequena porção do rim.

As gônadas devem ser colocadas sobre uma superfície rígida (ex: papelão) para mantê-las retas ao longo do processo de fixação.

Fixar em formaldeído a 10% por 24-48 horas, o volume do fixador deve ser 20 vezes o volume da amostra.

Após, retirar e conservar em álcool a 70%.



Figura III.1.1.5.1-1 - Gônada de indivíduo juvenil de tartaruga-verde encontrado encalhado morto no litoral do Paraná. Fonte: Rosa (2009).

III.1.1.2 - Processamento da amostra

Desidratação, clarificação e impregnação da amostra.

Clivar a gônada, retirando fragmento de no máximo 5 mm para o processamento histológico, de modo que o tecido excedente seja descartado.

Acondicionar o tecido clivado em cassetes histológicos identificados com o número de tombo do indivíduo.

Os fragmentos devem ser desidratados em diferentes concentrações de álcool etílico variando entre 70% até 100%, após diafanizados em xilol (Anexo VI.3 -).

Depois, devem ser impregnados em parafina.

III.1.1.3 - Inclusão e Microtomia

A inclusão deve ser feita em parafina líquida nova nos moldes de aço inoxidável. Com auxílio de uma pinça aquecida colocá-los em posição medial transversal e então, posicionar a base do cassete em contato com a parafina líquida para que seja fixado.

Levar os moldes com o material incluído para a placa de resfriamento.

Cortar o material com espessura de 5µm com auxílio de um micrótomo rotativo.

Os cortes devem ser colocados em banho-maria (40°C) com parafina histológica, para a distensão destes, e, coletados com auxílio de lâmina limpa e identificada.

Colocar as lâminas identificadas em estufa a 60°C por 24 horas para retirar o excesso de parafina.

III.1.1.4 - Coloração

Após, iniciar o processo de coloração, com a desparafinização em xilol, hidratação em série alcoólica decrescente (100% a 70%) até a água destilada, coloração em hematoxilina de Harris e eosina (Anexos VI.2.2 - e VI.2.3 -), desidratação em série alcoólica (70% a 100%), clarificação em xilol.

Por fim, a selagem da lâmina com resina sintética e lamínula.

III.1.1.5 - Análise de sexagem

A análise será feita em microscópio de luz e visa identificar o sexo e o estágio de desenvolvimento gonadal de machos e fêmeas com base na presença de células germinativas (ROSA, 2009). Os sexos serão identificados seguindo os critérios propostos por Wyneken et al. (2007) e Miller e Limpus (2003).

III.1.1.5.1 - Machos

Filhotes: células achatadas e escamosas, próximas a túnica albugínea, presença de túbulos seminíferos na medula com células germinativas situadas próximas ao interior da membrana (Figura III.1.1.5-1).



Figura III.1.1.5-1 - Gônada de filhote de *Chelonia mydas* A: Células germinativas; B: Médula com túbulos seminíferos; C. Túnica albugínea; D. Córtex. Fonte: Miller e Limpus, (2003).

Juvenis: gônadas com tecido menos condensado, córtex pouco desenvolvido, geralmente com uma camada de células de tamanho homogêneo, presença de túnica albugínea, caracterizada por uma membrana fina e fibrosa entre a medula e o córtex, e, medula composta por túbulos seminíferos revestidos por epitélio estratificado germinativo com células de Sertoli na região basal, envolvidos por núcleos fortemente basófilos e citoplasma pouco basófilo (Figura III.1.1.5-2).

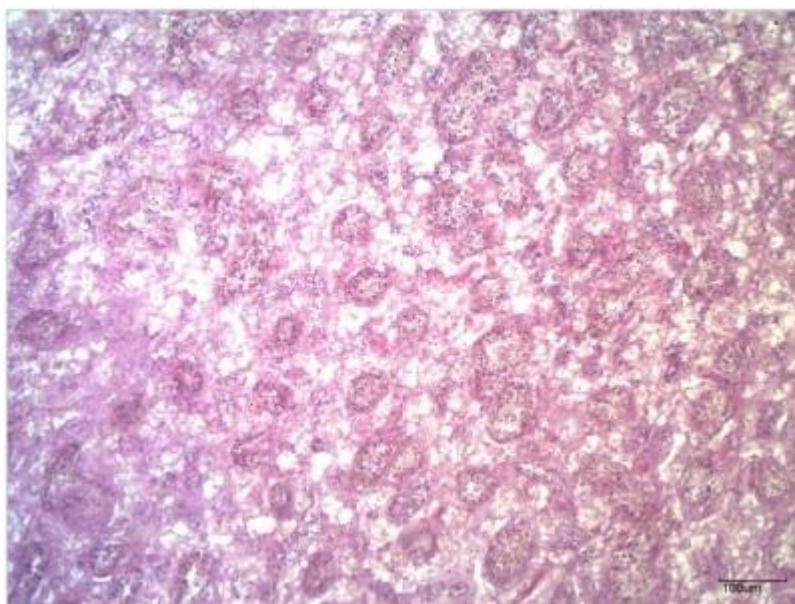


Figura III.1.1.5-2 - Gônada de macho juvenil de *Chelonia mydas* com túbulos seminíferos aparentes, aumento de 5x e corado em H/E. Fonte: Mariane Ferrarini Andrade, LEC/CEM/UFPR.

Adultos: córtex composto por epitélio achatado apoiado pela túnica albugínea, túbulos seminíferos na medula, envoltos por tecido conjuntivo frouxo. Encaixado no tecido conjuntivo entre os túbulos testiculares estão as células intersticiais (células de Leydig) que ocorrem isoladamente ou em pequenos grupos adjacentes a vasos sanguíneos. Espermatogônias na luz dos túbulos seminíferos, que durante o período reprodutivo dão origem aos espermátócitos primários. Células de Sertoli na membrana basal dos túbulos seminíferos (Figura III.1.1.5-3).

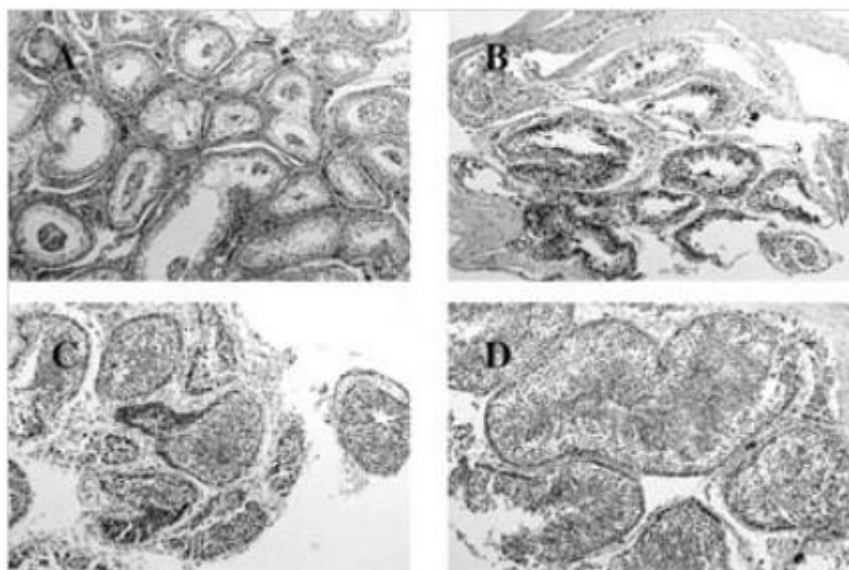


Figura III.1.1.5-3 - Testículo de adulto de *Chelonia mydas* A. Estágio 1; B. Estágio 2, Espermatócitos primários e espermatogônias; C. Estágio 4, espermátides em transição para espermatogônia; D. Estágio 6, espermatogênese máxima. Fonte: Miller e Limpus, (2003).

III.1.1.5.2 - Fêmeas

Filhote: células colunares, com células germinativas próximas a membrana basal, medula densa, com ocasionais sequências de células entre os vasos sanguíneos e outras células; ausência de túbulos com lúmen aberto (Figura III.1.1.5-4).

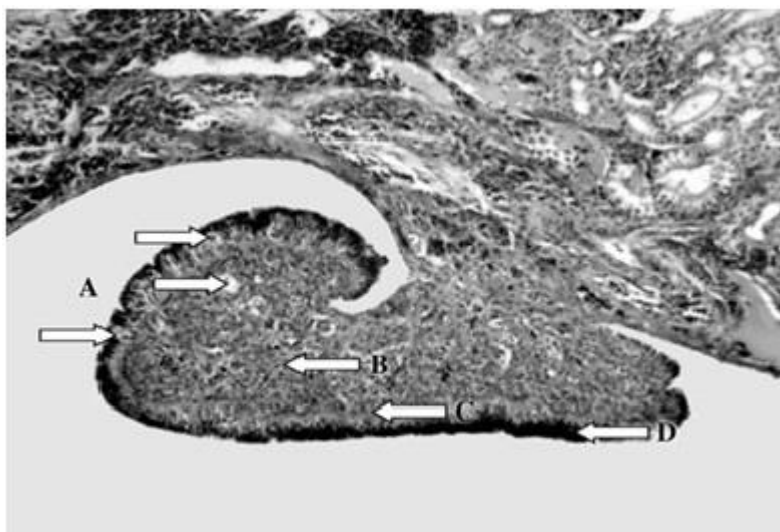


Figura III.1.1.5-4 - Gônada de fêmea filhote de *Chelonia mydas*. A. Células germinativas; B. Medula; C. Túnica albugínea; D. Córtex.
Fonte: Miller e Limpus, (2003).

Juvenis: gônada condensada com células germinativas bem aparentes, com medula desorganizada, córtex bem desenvolvido, formado por 2 a 5 camadas de células basófilas, presença de folículos ovarianos em diferentes fases de desenvolvimento no córtex, como folículos primordiais com núcleo eucromático, com oócitos em diferentes tamanhos com núcleos basófilos e múltiplos nucléolos com coloração mais escura envolvido pela zona pelúcida. Os ovários podem apresentar ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo caracterizados mais desenvolvidos os que apresentam vesículas ou grânulos citoplasmáticos (Figura III.1.1.5-5).

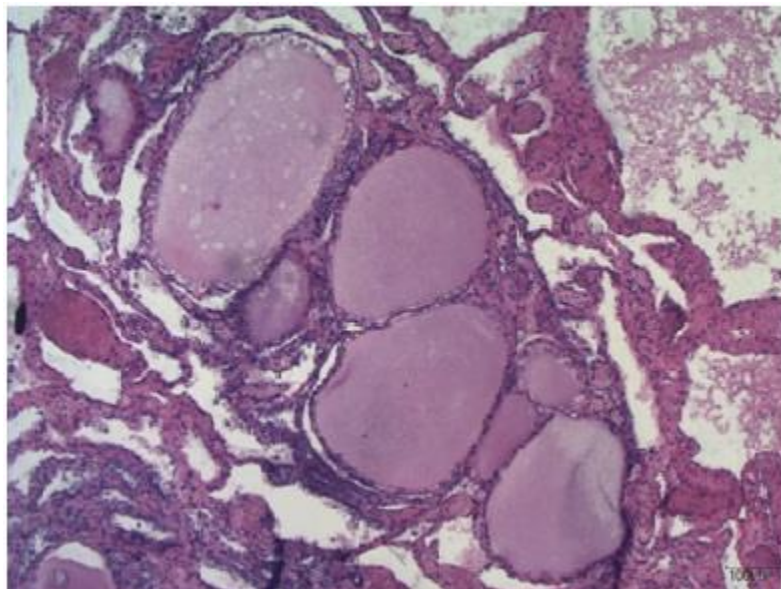


Figura III.1.1.5-5 - Gônada de juvenil de *Chelonia mydas* com presença de ovócitos com o citoplasma aumentado, aumento de 5x e corado em H/E. Fonte: Mariane Ferrarini Andrade, LEC/CEM/UFPR.

Adultas: ovário com folículos maduros, corpo lúteo e albicans (Figura III.1.1.5-6).



Figura III.1.1.5-6 - Ovário de *Caretta caretta* A. Folículo pré-ovulatório maduro; B. Folículos pré-vitelogênicos; C. Corpo Lúteo; D. Corpo Albicans; E. Vesícula com fluído; F. Folículo Atrésico. Fonte: Miller e Limpus, (2003).

III.1.1.6 - Classificação maturação de fêmeas

III.1.1.6.1 - Coleta das amostras

Durante a necropsia as gônadas deverão ser analisadas macroscopicamente em relação à aderência, textura e evidência de ducto paramesonéfrico, com o intuito de contribuir na identificação do sexo. Quanto à textura as gônadas devem ser agrupadas em: granulosa, lisa e mista (Figura III.1.1.6-1, Figura III.1.1.6-2), seguindo classificação proposta por Lutz et al. (2003). A presença de ducto paramesonéfrico e a aderência da gônada também devem ser registradas a fim de contribuir na análise de determinação do sexo. Gônadas com textura granulosa, aderência solta e presença de ducto paramesonéfrico serão caracterizadas como fêmeas, enquanto gônadas com textura lisa, aderidas e com ducto reduzido ou ausente serão caracterizadas como machos (MCCOY et al., 1983; VAN DER HEIDEN, 1985 e WIBBELS, 1998). Contudo, muitos indivíduos podem apresentar gônadas mistas, o que requer a realização de análise microscópica para a confirmação do sexo. Estas informações, assim como fotos das gônadas, do animal inteiro e dados biométricos deverão ser encaminhados juntamente com o material biológico para o Laboratório de Histologia encarregado destas análises.

Após a análise macroscópica, as gônadas devem ser removidas, fixadas em formol a 10% e conservadas individualmente em álcool a 70% em frascos com tampa de rosca identificados com papel vegetal que contenha o código do indivíduo.

III.1.1.6.2 - Análise das amostras

As gônadas devem ser pesadas (gramas) em balança digital com precisão de duas casas decimais e medidas com auxílio de um paquímetro (cm). Deverá ser realizado um corte com padrão transversal medial com relação ao comprimento máximo da gônada com espessura de 5 cm (Figura III.1.1.6-1). Os cortes deverão ser desidratados, diafinizados, impregnados, cortados em micrótomo e corados com Hematoxilina e Eosina (coloração HE), conforme indicações do protocolo de Kondak (2012) e orientações de Bremer et al. (1976).

As lâminas deverão ser analisadas em microscópio ótico. Para a caracterização de machos e fêmeas deverão ser considerados os critérios adotados por Miller e Limpus (2003). Os ovários serão definidos por apresentarem um córtex desenvolvido, com células germinativas e a porção medular densa. Os testículos serão definidos como as gônadas com um córtex mal desenvolvido e achatado. A medula neste caso possui os túbulos seminíferos com células germinais situados perto da membrana interna, apresentando ainda o lúmen nos túbulos. A classificação do estágio de desenvolvimento gonadal seguirá o proposto por Rosa (2005) (Figura III.1.1.6-2).

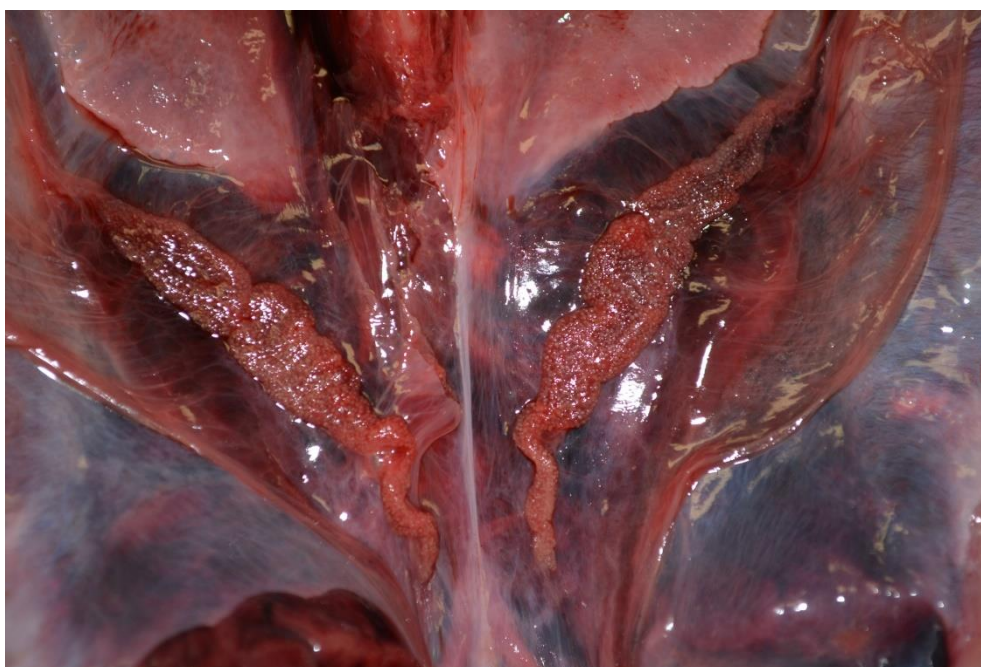


Figura III.1.1.6-1 - Gônadas granulosas de *Chelonia mydas juvenis*. Fonte: Thais de S. Barbosa, BIOPESCA.

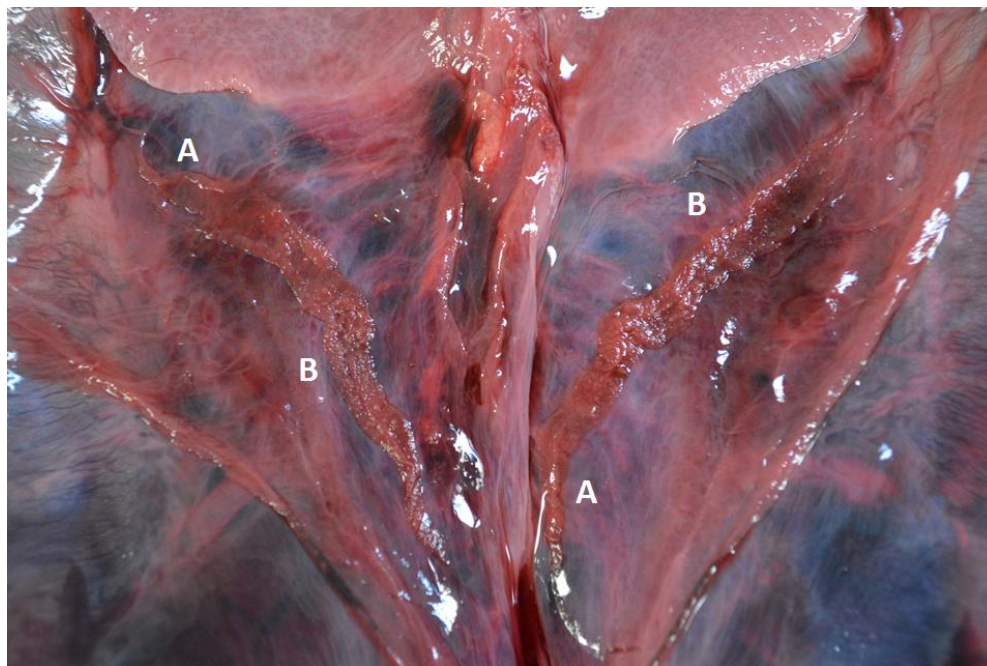


Figura III.1.1.6-2 - Gônadas mistas de *Chelonia mydas juvenis*, considerando que (A) é a porção lisa e (B) porção granulosa. Fonte: Thais de S. Barbosa, BIOPESCA.

III.2 -Aves

III.2.1 - Coleta das amostras

Durante a necropsia, as gônadas devem ser retiradas e fixadas em formol a 10%, sendo posteriormente fixadas em álcool a 70%. Devem ser armazenadas individualmente em recipiente com tampa de rosca e identificadas com papel vegetal, com o código do indivíduo escrito a lápis. A ave deverá ser fotografada em diferentes ângulos para o registro da plumagem do indivíduo, incluindo ambas as laterais, o dorso e da asa aberta, quando for o caso, assim como cabeça. As fotos, juntamente com os dados de biometria e peso da ave, deverão ser encaminhados ao laboratório de histologia indicado, juntamente com o material biológico, para compor a análise.

III.2.2 - Análise das amostras

As gônadas deverão ser pesadas (g) em balança digital com precisão de duas casas decimais e medidas em seu comprimento total (cm) utilizando paquímetro e com precisão de duas casas decimais. Deverá ser calculado também o peso relativo da gônada, com base no peso total da ave. Deverá ser registrado também o comprimento longitudinal dos ovários e oviduto, mensurados da extremidade cranial à extremidade caudal, e a medida transversal, aproximadamente no terço médio, das laterais da esquerda à direita, desprezando-se o maior e o menor diâmetro devido à morfologia irregular. O oviduto deverá ser medido a partir das extremidades cranial (infundíbulo) até à caudal (final da vagina próximo à cloaca). A seguir, o oviduto deverá ser submetido à incisão longitudinal para observação da mucosa, e logo depois devem ser retiradas secções não superiores a 0,5 cm das regiões identificadas macroscopicamente como infundíbulo, magno, útero e a vagina. Os fragmentos devem ser acondicionados em solução de formalina a 10%. No caso de fêmeas, apenas a gônada esquerda será analisada. Secções longitudinais e transversais deverão ser feitas para a realização dos procedimentos histológicos padrão, sendo coradas com a técnica de HE.

Na análise microscópica serão utilizadas as definições de Joyner (1994) e Moraes et al. (2012). Será avaliada a condição da gônada para identificar se o indivíduo estava em atividade reprodutiva ou em descanso reprodutivo, assim como seu estágio de desenvolvimento.

III.3 - Mamíferos marinhos

Antes de se iniciar a atividade deve-se averiguar se tanto os EPIs como os materiais necessários para a atividades estão disponíveis:

- luvas
- máscara
- jaleco
- Máquina fotográfica

- Paquímetro
- Régua
- Bandeja
- Pinças e tesouras cirúrgicas
- Balança de precisão
- Bisturi e lâminas
- Equipamentos do laboratório de histologia

III.3.1.1 - Coleta do material

As gônadas deverão ser retiradas durante a necropsia e fixadas em formol 10% em recipientes com tampa de rosca.

III.3.1.2 - Análise macroscópica

As gônadas serão primeiramente analisadas macroscopicamente, sendo tomados os dados de comprimento e largura (em centímetros, com auxílio de paquímetro, com precisão de uma casa decimal) (Figura III.1.1.6.2-1 e Figura III.1.1.6.2-2) e peso (em gramas, com balança digital e precisão de uma casa decimal) de ambos os lados. Os ovários serão examinados para verificar a presença de corpo lúteo ou corpo albicans visíveis macroscopicamente. Quando presentes, estes serão medidos no sentido ápice base.

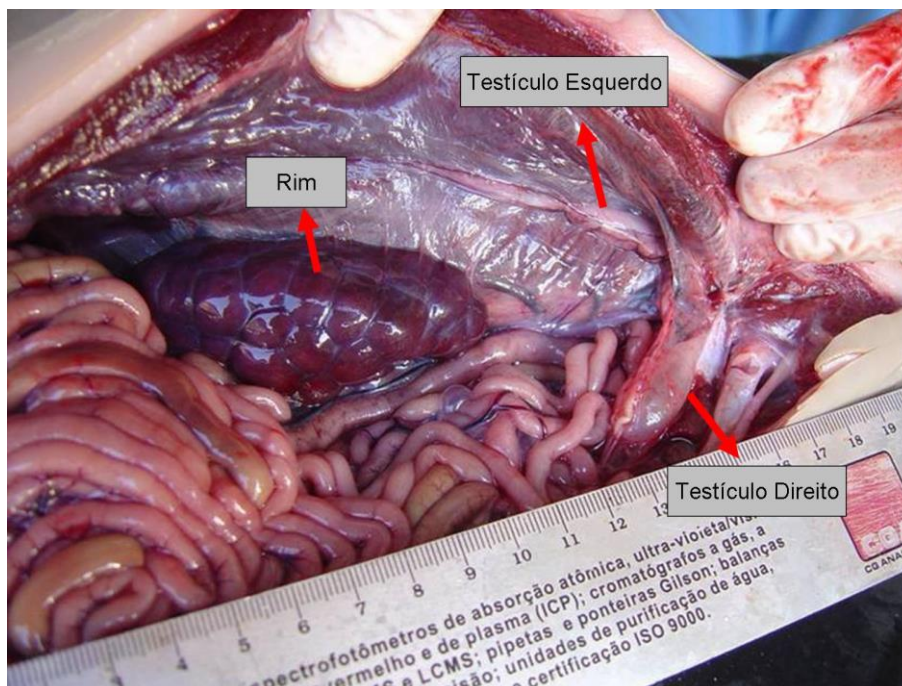


Figura III.1.1.6.2-1 - Posição dos testículos de um macho de *Pontoporia blainvillei*. Fonte: Carolina P. Bertozzi, Biopesca.

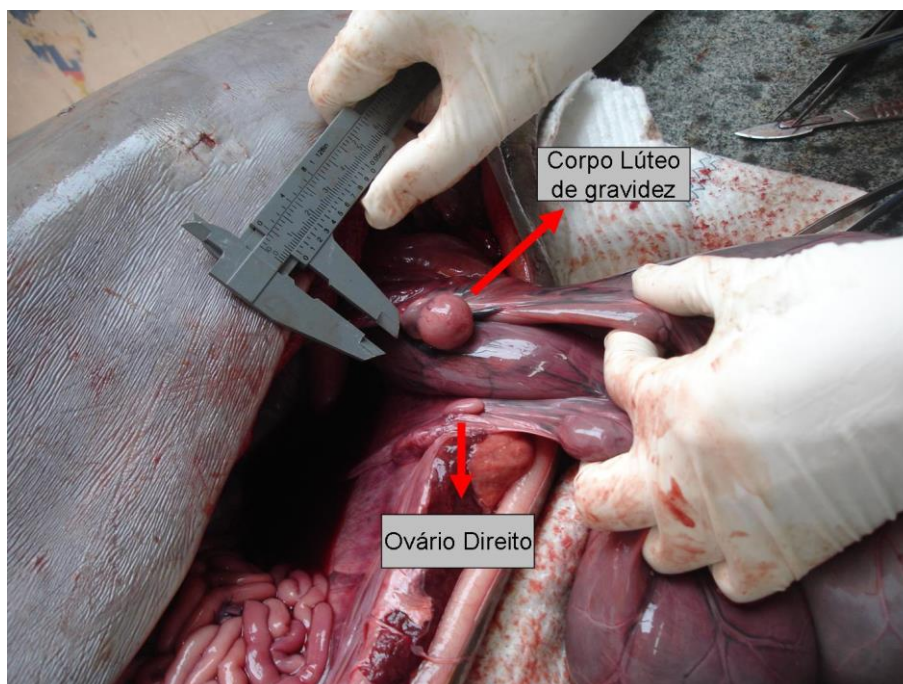


Figura III.1.1.6.2-2 - Posição dos ovários de uma fêmea de *Pontoporia blainvillei*. Em destaque: ovário direito e ovário esquerdo contendo corpo lúteo de gravidez. Fonte: Carolina P. Bertozzi, Biopesca

III.3.1.3 -Análise microscópica

Para a análise microscópica das gônadas deverão ser montadas preparações permanentes com cortes de testículos (incluindo epidídimo) e ovários com 5 µm de espessura, a partir do uso de técnicas de rotina para a preparação de tecidos (Bremer et al., 1976). Os cortes serão corados com hematoxilina e contra-corados com eosina (coloração HE). As preparações deverão ser examinadas em microscópio de luz transmitida sob aumento de 100 e 400 vezes.

A observação dos túbulos seminíferos e das diferentes células da linhagem espermatogênica, bem como a quantidade de substância intersticial, devem ser utilizadas para a avaliação da maturidade gonadal dos machos, segundo a classificação descrita abaixo (Hohn et al., 1985), sendo composta por três estágios:

- Imaturos: testículos com túbulos seminíferos contendo principalmente espermatogônias, lúmen totalmente fechado e abundante tecido intersticial entre os túbulos (Figura III.1.1.6.2-2).
- Púberes: testículos com túbulos seminíferos contendo espermatogônias e espermatócitos, lúmen pequeno e vazio e pouco tecido intersticial (Figura III.1.1.6.2-2).
- Maduros: testículos com túbulos seminíferos contendo espermatogônias, espermatócitos, espermátides e quase sempre espermatozóides, com grande lúmen e pouco tecido intersticial (Figura III.1.1.6.2-2).

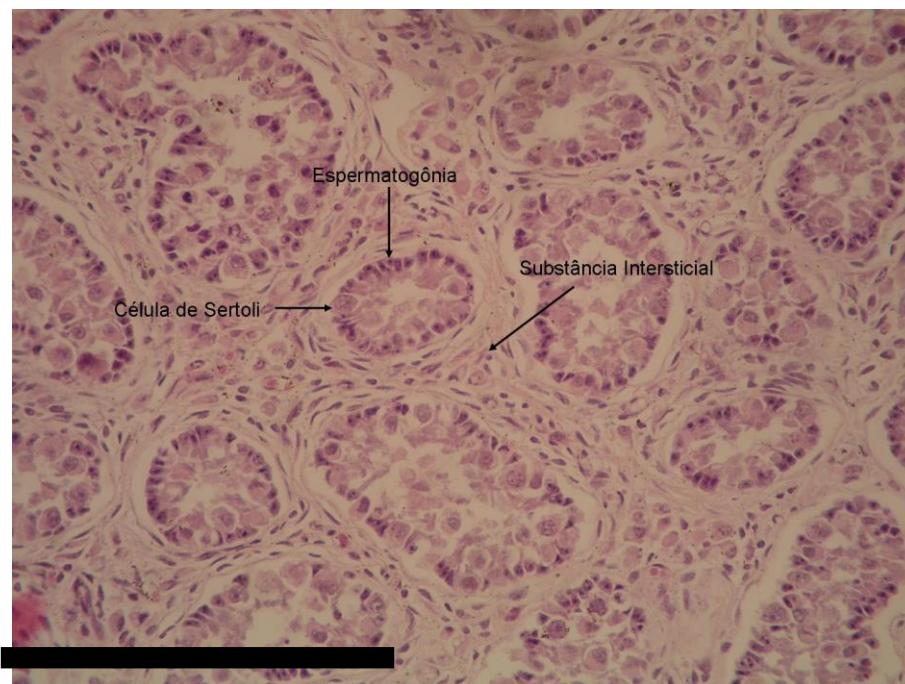


Figura III.1.1.6.2-1 - Fotomicrografia de testículo imaturo de *Pontoporia blainvillei*. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento: X 400. Escala: 50 μ m. Fonte: Carolina P. Bertozzi, Biopesca.



Figura III.1.1.6.2-2 - Fotomicrografia de testículo púber de *Pontoporia blainvillei*. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento: X 400. Escala: 50 μ m. Fonte: Carolina P. Bertozzi, Biopesca.

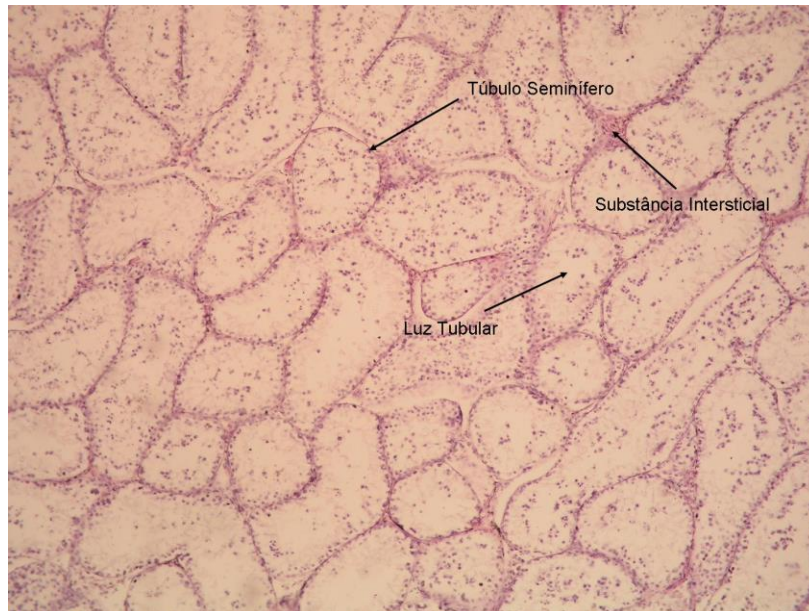


Figura III.1.1.6.2-3 - Fotomicrografia de testículo maduro de *Pontoporia blainvillei*. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento: X 100. Escala: 50 μ m. Fonte: Carolina P. Bertozzi, Biopesca.

Para a avaliação da maturidade gonadal das fêmeas deverá ser utilizada a terminologia recomendada pela International Whaling Commission (Perrin e Donovan, 1984) e para distinguir as fêmeas imaturas e púberes a classificação utilizada por Rosas (2000) (*Figura III.1.1.6.2-2*):

- Imaturas: ovários sem corpos de ovulação.
- Púberes: ovários sem evidências de ovulação, mas que contenham folículos de Graaf não-atréticos e com diâmetros superiores a 760 μm .
- Maduras: ovários com presença de pelo menos um corpo albicans (CA) ou de um corpo lúteo (CL).

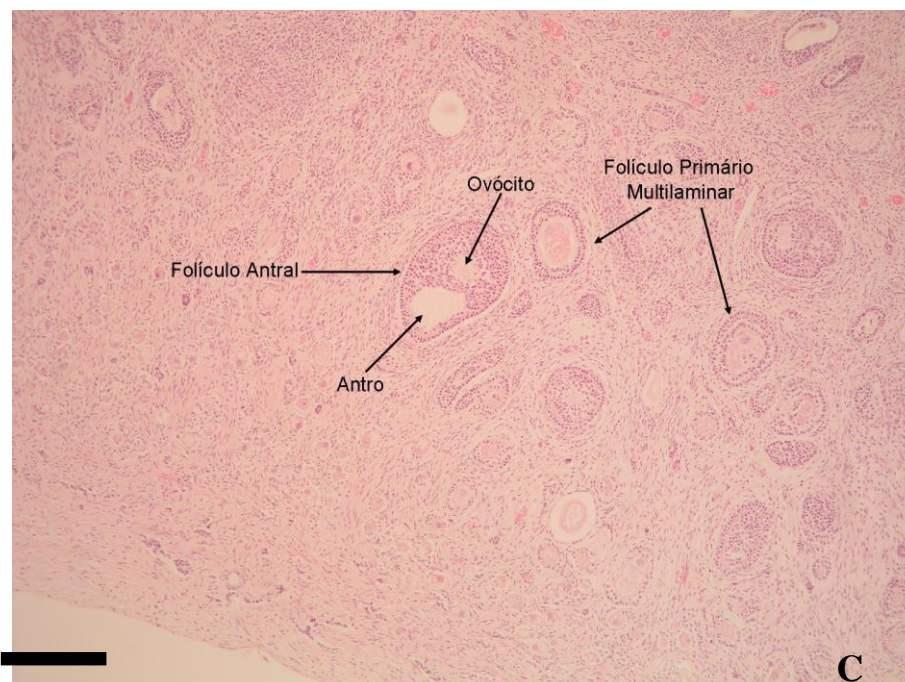


Figura III.1.1.6.2-4 - Fotomicrografias de ovário de *Pontoporia blainvillei* imatura. Aumento: X 100. Escala: 50 μm . Fonte: Carolina P. Bertozzi, Biopesca.

IV - REFERÊNCIAS

AVENS, L.; TAYLOR, J.C.; GOSHE, L.R.; JONES, T.T.; HASTINGS, M. Use of skeletochronological analysis to estimate the age of leatherback sea turtles *Dermochelys coriacea* in the western North Atlantic. **Endangered Species Research**, v. 8, p. 165-177. 2009.

BERTOZZI, C. P. **Interação com a pesca: implicações na conservação da toninha, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae) no litoral do estado de São Paulo, SP.** Tese de Doutorado – (Oceanografia Biológica)- Departamento do Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo. 209 p. 2009.

BREMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** São Paulo: Edart/EDUSP, 256 p., 1976.

CASTANET, J.; SMIRINA, E. Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. **Ann Sci Nat Zool.**, v.13, n. 11, p. 191–196. 1990.

FETTUCCIA, D.C. **Variação osteológica e desenvolvimento ontogenético das espécies do gênero *Sotalia* (Cetacea, Delphinidae).** Tese de doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM. 2010.

HOHN, A.A., CHIVERS, S.J.; BARLOW, J. Reproductive maturity and seasonality of male spotted dolphins, *Stenella attenuata*, in the eastern tropical Pacific. **Marine Mammal Science**, v. 1, n. 4, p. 273-293, 1985.

HOHN, A.A., SCOTH, M.D., WELLS, R.S., SWEENEY, J.C.; IRVINE, A.B. Growth layers in teeth from known age, free-ranging bottlenose dolphins. **Marine Mammal Science**, v. 5, (4), p. 315-342. 1989.

HYLLAND, K.; LANG, T.; VETHAAK, A.D. **Biological effects of contaminants in marine pelagic ecosystems.** Bruxelas: SETAC Press, 475 p. 2006.

KONDAK, H. C. **Análise da proporção sexual e do desenvolvimento gonadal da tartaruga-verde, *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), no litoral norte e médio do Rio Grande do Sul.** Trabalho de Conclusão de Curso de Pós-Graduação Lato Sensu, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 41p. 2012.

LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A.; WYNEKEN, J. **The Biology of Sea Turtles**. vol. II. CRC Press. Washington. 257 p. 2003

MASCARENHAS, S. S. **Morfologia do sistema reprodutor feminino de arara-canindé *Ara ararauna* (Linnaeus, 1758)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, 69p. 2007.

MCCOY, C. J.; VOGT, R. C.; CENSKY, E.J. Temperature-controlled sex determination in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. **J. Herpetol.** v. 17, p. 404–406 p. 1983.

MILLER, J. D.; LIMPUS C. J. Ontogeny of marine turtle gonads. In: Lutz, P. L., Musick, J. A. & Wyneken, J. **The Biology of Sea Turtles**. CRC Press. Boca Raton, Florida, U.S.A. vol. II, 199–224 p. 2003.

MORAIS, M. R. P. T.; VELHO, A. L. M. C. S.; DANTAS, S. E. S. & FONTENELENETO, J. D. Morfofisiologia da reprodução das aves: desenvolvimento embrionário, anatomia e histologia do sistema reprodutor. **Acta Veterinaria Brasilica** v. 6, p. 165-176. 2012.

PARHAM, J.F.; ZUG, J.R. Age and growth of loggerhead sea turtles of coastal Georgia: an assessment of skeleto-chronological age-estimates. **Bull. Mar. Sci.**, v. 61, p. 287–304. 1997.

PERRIN, W. F.; DONOVAN, G. P. Report of the workshop. In: Perin, W. F.; Brownell, R. I.; De Master, D. P. **Reproduction in whales, dolphins and porpoises. Rep. Int. Whal. Comm. Spec**, n. 6, p. 97-134, 1984.

PERRIN, W.F.; MYRICK J.R. **Age determination of toothed whales and sirenians**. International Whaling Commission, special issue 3. Cambridge, U.K. 1980.

PIERCE, V.K., KAJIMURA, H. Acid etching and highlighting for defining growth layers in cetacean teeth. **Rep. Int. Whal. Comm. Special Issue**. 3, p. 99-101. 1980.

PINEDO M.C.; A.A. HOHN. Growth layer patterns in teeth from the franciscana, *Pontoporia blainvillei*: developing a model for precision in age estimation. **Marine Mammal Science**, v. 16, p.1-27. 2000.

PODULKA S.; ROHRBAUGH, R. W.; BONNEY, R. (eds.) (2004) **Handbook of bird biology**. Ithaca, N.Y.: Cornell Laboratory of Ornithology.

RAMOS, R.M.A. ROSAS, F.C.W. SIMÕES-LOPES, P.C., ZANELATTO, R.C. E DANS, S., CRESPO, E.A. Estimativa de idade. *In: Biologia, ecologia e conservação do boto-cinza*. Páginas e Livros Editora e Gráfica, São Paulo. pp. 193-209. 2008.

RAMOS, R.M.A.; DI BENEDITTO, A.P.M. **Guia para estudo de cetáceos: Métodos para determinação de idade em cetáceos odontocetos**. Ed. da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. 2005.

ROSA, L. **Biologia reprodutiva da tartaruga marinha *Chelonia mydas* no litoral paranaense**. Monografia (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil. 30p. 2009.

ROSAS, F. C. W. **Interações com a pesca, mortalidade, idade, reprodução e crescimento de *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Delphinidae e Pontoporiidae) no Litoral Sul do Estado de São Paulo e Litoral do Estado do Paraná, Brasil**. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 145 p. 2000.

ROSAS, F. C. W. **Interações com a pesca, mortalidade, idade, reprodução e crescimento de *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Delphinidae) no litoral sul do Estado de São Paulo e litoral do Estado do Paraná, Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná. 2000.

ROSAS, F.C.W., BARRETO, A.S., MONTEIRO-FILHO, E.L.A. Age and growth of the estuarine dolphin (*Sotalia guianensis*) (Cetacea, Delphinidae) on the Paraná coast, southern Brazil. **Fishery Bulletin** v. 101, p. 377–383. 2003.

SNOVER, M.L.; HOHN, A.A. Validation and interpretation of annual skeletal marks in loggerhead (*Caretta caretta*) and Kemp's ridley (*Lepidochelys kempii*) sea turtles. **Fish Res.**, p. 682–692. 2004.

SYDNEY, N.V.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A. Efficiency of wear and decalcification technique for estimating the age of estuarine dolphin *Sotalia guianensis*. **J. Biosci.** v. 36, n. 1, p. 117–121. 2011.

VAN DER HEIDEN, A. M.; BRISENO-DUENAS, R.; RIOS-OLMEDA, D. A simplified method for determining sex in hatchling sea turtles. **Copeia**. p. 779–782. 1985.

WANDERLEY, R.P. **Estrutura etária do boto-cinza, *Sotalia guianensis*, no sul de sua distribuição: Uma avaliação dos encalhes e interação com redes de pesca.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 2013.

WIBBELS, T.; ROSTAL, D. C.; BYLES, R. High pivotal temperature in the sex determination of the olive ridley sea turtle from Playa Nancite, Costa Rica. **Copeia**. 1086–1088 p. 1998.

WINEKEN, J.; EPPERLY, S. P.; CROWDER, L. B.; VAUGHAN, J.; ESPER, K. B. Determining sex in posthatchling loggerhead sea turtles using multiple gonadal and accessory duct characteristics. **Herpetologica**, v. 63, n. 1, p. 19 – 30. 2007.

ZUG, G.R.; WYNN, A.H.; RUCKDESCHE, C.A. Age determination of loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*, by incremental growth marks in the skeleton. **Smithson Contrib. Zool.**, p. 1–34. 1986

V - GLOSSÁRIO

Para fins deste protocolo são consideradas as seguintes definições:

Mandíbula	do inglês "lower jaw", é o componente móvel do crânio que compõe a parte inferior da cabeça.
Maxila ou osso maxilar	do inglês "upper jaw", é o componente superior do aparato bucal onde se encontra o palato
<i>Ear plug</i>	parte do ouvido interno de misticetos utilizada para estudos envolvendo estimação de idade, contaminação, dentre outros. É uma estrutura com cerca de 15cm em média, formada por queratina e lipídeos encontrada no meato auditivo dos misticetos
GLG	“Growth Layer Group”, ou seja, “Grupo de Camada de Crescimento” presente na dentina e cimento dos dentes de mamíferos marinhos. De acordo com cada espécie, cada GLG pode representar 1, 2 ou mais anos de idade.

VI - ANEXOS

VI.1 - Ficha para medição do osso úmero.

Medido por: _____	ID# Tartaruga: _____
Data: _____	
Úmero dir/erq _____	
Comprimento da carapaça:	
Curvilíneo: _____	
Retilíneo: _____	
Sexo: _____	
Medidas:	
CT: _____, CL: _____	
LP: _____, LPDP: _____	
LM: _____, LD: _____	
E: _____, Peso: _____	

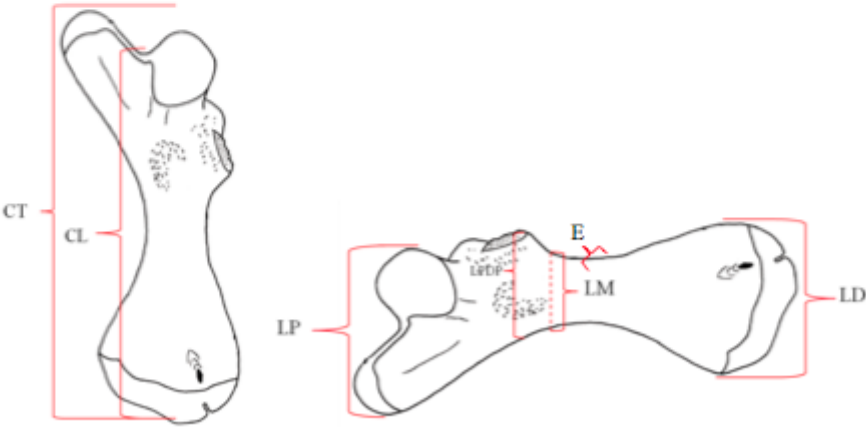


Figura VI.1-1 – Medidas a serem tomadas dos úmeros de tartarugas marinhas: CT: comprimento total; CL: comprimento itludinal; LP: largura proximal; E: espessura; LM: largura média; LPDP: largura proximal do delto-pectoral; LD: largura distal..

VI.2 -Receitas de corantes

VI.2.1 -Receita da hematoxilina de Ehrlich.

Fórmula:	1	1/4
Hematoxilina cristal.....	4,0g	/ 1,0g
Etanol (95%).....	200,0ml	/ 50,0ml
Sulfato potássico de Alumínio.....	6,0g	/ 1,5g
Água destilada.....	200,0ml	/ 50,0ml
Glicerina.....	200,0ml	/ 50,0ml
Ácido acético glacial.....	20,0ml	/ 5,0ml
Iodato de sódio.....	0,3g	/ 0,075g

VI.2.2 - Hematoxilina de Harris (Harris, 1900)

Hematoxilina	5,0 g
Etanol a 100%.....	50,0 mL
Alúmen de potássio ou de amônio.....	100,0 g
Água destilada.....	1.000,0 mL
Óxido mercúrio (pó vermelho) (HgO).....	2,5 g
Ácido acético glacial.....	20,0 mL

Dissolva o alúmen em água destilada com o auxílio de uma placa aquecedora e um agitador magnético em um recipiente. Dissolva a hematoxilina no álcool à temperatura ambiente, em recipiente separado. Lentamente, misture as duas soluções aquecendo em placa aquecedora, até entrar em ebulição. Retire da fonte de calor e, acrescente lentamente o óxido mercúrio, que faz com que a solução entre rapidamente em ebulição, podendo transbordar do recipiente. Retorne a solução para a fonte de calor até que adquira a cor púrpura-escura. Esfrie, e a solução estará pronta. Filtre sempre antes de cada uso.

VI.2.3 – Eosina

Eosina amarelada em pó.....0, 25g

Água destilada.....100 mL

VI.3 -Desidratação e Clarificação Do Material

Álcool 80% por, no mínimo 2 horas

Álcool 90% por pelo menos 2 horas

Álcool 95% durante 1 dia (*overnigth*)

Álcool absoluto:

1º banho – pequenos fragmentos por 45 minutos; maiores por 1 a 1.5 hora

2º banho – 30 minutos

3º banho – 30 minutos

4º banho – 15 minutos

Álcool absoluto mais xilol (benzol) 1:1– 30 minutos

Xilol:

1º banho – 15 minutos

2º banho – 15 minutos

3º banho – 10 minutos

Material levado á parafina líquida, na estufa a 60°C, por 4 horas, sendo 4 banhos de 1 hora cada. A parafina deve ser sempre filtrada antes de ser utilizada.

VI.4 - Coloração e Montagem Das Lâminas

Desparafinização

1º banho Xilol – 10 minutos •

2º banho Xilol – 10 minutos

Hidratação

1º banho Álcool 100% – 5 minutos •

2º banho Álcool 95% – 5 minutos •

3º banho Álcool 70% – 10 minutos

Lavagem

Água destilada – 5 minutos

Coloração

Hematoxilina de Harris por 2 a 10 minutos (podendo variar o tempo de acordo com os resultados obtidos);

Lavagem

Água corrente – 3 minutos (até que a água da cuba fique transparente).
Aproveitar esta etapa para após limpar cuidadosamente o excesso de hematoxilina do entorno do corte

Coloração

Álcool 70%– 1 imersão;

Eosina – 4 imersões;

Lavagem

Água – 2 minutos

Desidratação

4º banho Álcool 70% – 5 minutos

5º banho Álcool 95% – 5 minutos

6º banho Álcool 100% – 5 minutos

7º banho Álcool 100% – 5 minutos

Fixação do corante e conservação do material

3º banho Xilol + Álcool 100% (1:1) – 10 minutos •

4º banho Xilol – 5 minutos

5º Xilol montagem

Montagem

Escorrer o excesso de xilol e com resina colocar a lamínula sobre o corte verificando para que não permaneçam bolhas de ar.

VII - COLABORADORES

A elaboração deste protocolo foi um esforço colaborativo dos diversos pesquisadores envolvidos no PMP-BS, além de especialistas externos convidados a contribuir em áreas específicas. Neste documento contribuíram os seguintes profissionais:

Carolina Pacheco Bertozzi

Projeto BIOPESCA

Marcos César de Oliveira Santos

Instituto Oceanográfico, USP

Mariane Ferrarini Andrade

LEC/CEM/UFPR

Marta Jussara Cremer

Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE

Rebeca Pires Wanderley

Instituto de Pesquisas Cananéia - IPeC

André S. Barreto (org.)

Lab. de Informática da Biodiversidade e Geoprocessamento, CTTMar, UNIVALI

VIII - EQUIPE TÉCNICA***Equipe da UNIVALI***

Profissional	André S. Barreto
Empresa	UNIVALI
Registro no Conselho de Classe	21.500/03-D
Cadastro Técnico Federal de Atividades e Instrumentos de Defesa Ambiental	358880
Responsável pela(s) Seção(ões)	I a VI
Assinatura	Lab. de Informática da Biodiversidade e Geoprocessamento, CTTMar, UNIVALI

Profissional	Mariana Carrion
Empresa	UNIVALI
Registro no Conselho de Classe	95368/03
Cadastro Técnico Federal de Atividades e Instrumentos de Defesa Ambiental	--
Responsável pela(s) Seção(ões)	I a VII
Assinatura	Lab. de Informática da Biodiversidade e Geoprocessamento, CTTMar, UNIVALI