FERNANDA MAGNO AMARAL

Estratégias reprodutivas da serpente

Bothrops alternatus

influência de fatores ambientais

São Paulo
2015

FERNANDA MAGNO AMARAL

Estratégias reprodutivas da serpente *Bothrops alternatus*: influência de fatores ambientais

São Paulo
2015

FERNANDA MAGNO AMARAL

Estratégias reprodutivas da serpente *Bothrops alternatus*: influência de fatores ambientais

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:
Profa. Dra. Selma Maria de Almeida Santos

São Paulo
2015

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.3146
FMVZ

Amaral, Fernanda Magno
Estratégias reprodutivas da serpente *Bothrops alternatus*: influência de fatores ambientais / Fernanda
Magno Amaral. -- 2015.
131 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador: Profa. Dra. Selma Maria de Almeida Santos

1. Urutu cruzeiro. 2. Ciclo reprodutivo. 3. Gametogênese. 4. Cópula. 5. Estocagem de esperma.
I. Título.

ERRATA

AMARAL, F. M. Estratégias reprodutivas da serpente *Bothrops alternatus*: influência de fatores ambientais. 2015. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Página

Onde se lê

Leia-se

Ficha
catalográfica

Estratégias reprodutivas da serpente *Bothrops alternatus*:
influência de fatores ambientais

Estratégias reprodutivas da serpente *Bothrops alternatus*:
influência de fatores ambientais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estratégias reprodutivas de *Bothrops alternatus* (squamata: viperidae) do Brasil: influência de fatores ambientais", protocolado sob o nº 2877/2013, utilizando 200 (duzentos) exemplares de serpentes adultas e 90 (noventa) exemplares de filhotes, sob a responsabilidade da Dra. Selma Maria Almeida Santos, foi aprovado em reunião de 15/5/2013 e 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.

We certify that the Research "Reproductive strategies of *Bothrops alternatus* (Squamata: Viperidae) from Brazil: influence of environmental factors", protocol number 2877/2013, utilizing 200 (two hundred) copies of adult snakes and 90 (ninety) copies of puppies, under the responsibility Dra. Selma Maria Almeida Santos, was approved in the meeting of day 5/15/2013 and 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.

São Paulo, 4 de maio de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: AMARAL, Fernanda Magno

Título: Estratégias reprodutivas da serpente *Bothrops alternatus*: influência de fatores ambientais

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*“O paraíso não é um lugar, é um breve
momento que conquistamos.”*

Mia Couto

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe que sempre acreditou em mim, me incentivou e sempre esteve ao meu lado. Pelo seu amor incondicional, pelas noites mal dormidas ou nem dormidas tentando me ajudar a solucionar meus problemas. Me ajudando a minimizar a saudade e a dificuldade de estar longe de casa. Mãe muito obrigada por tudo, este trabalho é para você!

Também ao meu pai que tem me dado apoio e força nessa longa caminhada. Com suas palavras de carinho e amizade. Por tudo que tem feito por mim e por sempre acreditar e incentivar meu trabalho. E ao meu querido irmão que tanto amo. Que me ajudou muito e fez com que a distância da família não fosse tão ruim. Sempre, com seu jeito tímido, me ajudou muito e seu carinho e companheirismo se fez e se faz muito importante na minha vida.

AGRADECIMENTO

À minha orientadora Selma Almeida-Santos. Muito obrigada por me abrir as portas desde “pequeninha” quando nos encontramos no congresso de Curitiba e eu sem saber muito de reprodução. Me encorajou e acreditou no meu potencial. Obrigada pela orientação, pela amizade, pelos bons e nem muito bons momentos vividos e compartilhados contigo.

Ao Otávio A. V. Marques por me receber no laboratório de ecologia e evolução, pelas sugestões e conselhos no meu trabalho.

Aos curadores das coleções científicas que me receberam tão bem nas coleções: Giselle Agostini Cotta e Flávia Cappuccio Resende da FUNED, Luciana Barreto Nascimento da PUC-MG, Maria Rita Silvério Pires da UFOP, Paulo Passos da MNRJ, Breno Hamdan do IVB e Valdir José Germano do Instituto Butantan. E também aos curadores que puderam me enviar os espécimes via correio quando não pude ir até a coleção: Paulo Garcia da UFMG, Vinicius Xavier da Silva da Universidade Federal de Alfenas, Ísis da Costa Arantes e Guarino Rinaldi Colli da UNB, Sonia Zanini Cechin e Luíza Loebens da UFSM e Moema Leitão de Araújo do Museu de Ciências Naturais.

Ao Ricardo Ciancio, meu estagiário, que me ajudou muito com as dissecções das serpentes.

À Karina M. P. da Silva, por me ensinar os passos da confecção das lâminas histológicas, por ter paciência de me ensinar como fazer as mensurações das estruturas histológicas, as estatísticas e climatogramas do meu trabalho. Até mesmo aos sábados.

À Daniela Petrim de Araújo pela ajuda com a distribuição geográficas da *B. alternatus*, pelo mapa de ocorrência desta serpente e pela super boa vontade de me ajudar nesse pedaço do trabalho.

À Franceliusa Delys pela ajuda com as fotomicrografias e ao Antonio C. Assis Neto pela permissão ao uso do fotomicroscópio.

Ao Cristian Alexandro Gomes por sempre me ajudar com toda boa vontade do mundo, me acalmar dos meus desesperos e me ensinar a colocar shape no diva-gis e a mexer no programa e me ensinar estatística.

Ao Diego Muniz-da-Silva por me tirar dúvidas e me aguentar nos meus desesperos me dando apoio.

À Caroline Sayuri Fukushima por sua leitura crítica à minha dissertação.

À Diva D. S. Morena por gentilmente liberar o uso do fotomicroscópio em seu laboratório e Magna pelas valiosas sugestões.

À Marta Maria Antoniazzi e Carlos Jared por também, gentilmente, terem liberado o uso dos equipamentos no Laboratório de Biologia Celular e ao “perereca” pelo auxílio no uso dos equipamentos.

À minha mãe Edna Magno por se dispor a vir para São Paulo e me ajudar na anotação de dados e confecção de planilhas das serpentes e mesmo sem entender do assunto pode me ajudar muito na elaboração destes, até nas madrugadas. Você foi fundamental, principalmente nesse final da dissertação.

Aos funcionárias do Laboratório de Ecologia e Evolução, Dona Maria M. Vendramini, Darina B. Favorito, Vera Moraes Torres, Dona Marta, Kelly Kishi, Adriana Batista, Adriano Fellone, Cristiene Martins, Regina Elaine da Silva pelas ajudas com tudo que precisei no laboratório, pelo carinho e paciência.

Aos funcionários da pós-graduação por sempre estarem dispostos a sanarem minhas dúvidas, Henrique e Thais. À Jaqueline Martins, secretária do programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, por ser uma fofa e sempre me ajudar com os documentos e o que for preciso. Ao pessoal da biblioteca, em especial à Elza Faquim pela agilidade e atenção na revisão de minha dissertação.

Aos amigos que fiz ao longo desse caminho no laboratório de ecologia e evolução: Karina Silva, Kalena Barros, Rafaela Coeti, Ingrid Stein, Igor Federsoni, Miguel Lobo, Erick Bassi, Karina Banci, Natália Torello, Cristian Alexandro, Lucas Siqueira, Paulo Machado, Silara Batista, Alex Silveira, Carol Fukushima pela amizade, por nossas

rizadas e choros. Vocês fazem parte desta conquista. E certamente aos Fundap's e estagiários: Juliana Passos, Thiago Cinco, Priscila Fabio.

Em especial à minha querida amiga Serena Migliori por toda ajuda que me deu quando estive ausente no laboratório, e estava em meus trabalhos de campo. Por todo o apoio e amizade, por nossas longas conversas no famoso “banquinho” rsrs.

Aos meus queridíssimos amigos do IB, Instituto de Biociências: Júlia Beneti, Thiago Loboda e Flávia Petean, que foram muito importantes nessa minha trajetória.

Aos amigos dos trabalhos de campo, os quais estavam do meu lado em momentos muitos difíceis e que me deram suporte em tudo que precisei e serão meus irmãos de coração para sempre. Obrigada Ana Soares, Gustavo Silveira, Érika Fröhvald, Celso Rios e Thatiana Quesada os quais amo de paixão. E sem contar na força que me deram e de horas que “perderam” ao me ajudar a separar meu material para a confecção das lâminas histológicas e me ajudarem a fazer minhas planilhas. Sou muito grata a vocês.

Às minhas grandes amigas Ana Luiza Sales, Érica Munhoz e Giovanna Giudicelli, que carrego no meu coração todos os dias da minha vida, mesmo longe estiveram sempre ao meu lado e foram fundamentais em todos os passos da minha pesquisa.

E em especial um agradecimento à minha família que sem eles nada disso seria possível. Amo vocês incondicionalmente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo auxílio financeiro em alguns meses desta pesquisa.

A todos que de alguma forma foram importantes nesse caminho e que puderam me ajudar no desenvolvimento de minha dissertação.

Muito obrigada por tudo!! 😊

RESUMO

AMARAL, F. M. **Estratégias reprodutivas da serpente *Bothrops alternatus*: influência de fatores ambientais.** [Reproductive strategies of the snake *Bothrops alternatus*: influence of environmental factors]. 2015. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Nas últimas décadas tem se dado maior atenção à reprodução de animais silvestres, visto que para se conhecer e preservar uma espécie se faz necessário o conhecimento da história natural aliado aos processos da fisiologia e morfologia reprodutivas. Ciclos reprodutivos podem ser sazonais ou assazonais e apresentar variações em ambos os padrões. Por sua natureza e diversidade de fatores associados (e.g., atividade, dieta, temperatura), as estratégias reprodutivas vêm sendo investigadas sob uma abordagem evolutiva. Estudos do comportamento reprodutivo e dimorfismo sexual também têm sido destacados nesse âmbito. No entanto, poucos trabalhos são realizados para se conhecer as estratégias reprodutivas em serpentes neotropicais. Na maioria das vezes tais trabalhos abordam apenas alguns aspectos do ciclo reprodutivo de serpentes, como época de nascimentos, cópula e gestação, podendo ainda ser descritos de forma divergente pelo fato de muitos destes estudos serem norteados por dados de serpentes em cativeiro. Estudos microscópicos e macroscópicos, delineados com animais recém-chegados da natureza e preservados em coleções científicas, pode fornecer uma descrição e uma análise mais efetiva do ciclo reprodutivo permitindo a integração destes fatores. Assim, este trabalho investigou diversos aspectos da biologia reprodutiva de fêmeas e machos de populações de *Bothrops alternatus* do Brasil. Além disso, foram analisadas e descritas as estratégias reprodutivas empregadas por ambos os sexos durante o ciclo reprodutivo anual. Para isso, os espécimes foram dissecados ventralmente retirando-se fragmentos das gônadas e vias genitais de fêmeas e machos, em diferentes épocas do ano, a fim de se identificar as principais fases do ciclo vitelogênico, espermatogênico e do segmento sexual renal. Igualmente, para determinar se há estocagem de esperma nas fêmeas e nos machos, será investigada o útero aglandular e região do infundíbulo, vias genitais e ductos deferentes respectivamente. Tais dados permitirão compor um padrão

reprodutivo, para essa espécie, levando-se em conta processos morfofisiológicos em ambos os sexos. Também foi realizada uma comparação dos ciclos reprodutivos entre populações de *Bothrops alternatus* e análises de possíveis influências ambientais na duração dos eventos reprodutivos.

Palavras-chave: Urutu cruzeiro, Ciclo reprodutivo, Gametogênese, Cópula, Estocagem de esperma.

ABSTRACT

AMARAL, F. M. **Reproductive strategies of the snake *Bothrops alternatus*: influence of environmental factors.** [Estratégias reprodutivas da serpente *Bothrops alternatus*: influência de fatores ambientais]. 2015. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Over the last decades a greater attention has been given to the reproduction of wild animals, as the knowledge of natural history combined with the processes of reproductive physiology and morphology is essential for the preservation of a species. Reproductive cycles may be seasonal or not, and both patterns may have variations. Due to its nature and to the diversity of the associated factors (e.g., activity, diet, temperature), reproductive strategies have been investigated in an evolutionary approach. Studies of reproductive behavior and sexual dimorphism have also been highlighted in this context. However, few studies have been conducted to determine reproductive strategies in neotropical snakes. Most studies address only some aspects of the reproductive cycle of snakes, such as time of birth, copulation and pregnancy, and may present divergent descriptions as many of them are based on data from snakes in captivity. Microscopic and macroscopic studies carried out with animals newcomers from nature and preserved in scientific collections can provide a more effective analysis of the reproductive cycle allowing the integration of these factors. In this context, this project aims to investigate various aspects of the reproductive biology of female and male populations of *Bothrops alternatus* from Brazil. The reproductive strategies employed by both sexes during the annual reproductive cycle was analyzed and described. The specimens was dissected ventrally and fragments of gonads and genital tracts of females and males was removed at different times of the year in order to identify the main phases of the vitellogenic cycle, spermatogenesis and sexual segment of the kidney. Also, to determine whether sperm storage is done by females and males, we will investigate the aglandular uterus, the posterior infundibulum, genital tracts and vas deferens respectively. Such data was compose a reproductive pattern for the species that will take into account the morphophysiologic processes of both sexes. It was also performed a comparison of reproductive cycles between populations of *Bothrops*

alternates and analysis of possible environmental influences in the duration of reproductive events.

Keywords: Urutu cruzeiro, Reproductive cycle, Gametogenesis, Mating, Sperm storage.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 - Exemplar adulto de uma fêmea da serpente <i>Bothrops alternatus</i>	21
Figura 2 - Mapa com a distribuição geográfica (área em vermelho) de <i>Bothrops alternatus</i>	22
Figura 3 - Distribuição geográfica dos espécimes analisados	31
Figura 4 - Caracterização climática das regiões amostradas. Médias históricas (1950-2000) de temperaturas máximas (linha vermelha), mínima (linha azul) e pluviosidade (barras).....	32
Figura 5 - Mensuração do diâmetro do maior folículo no ovário. Folículo em vitelogênese secundária.....	34
Figura 6 - Sistema reprodutor de fêmea de <i>Bothrops alternatus</i> . Fragmentos coletados para estudo.....	36
Figura 7 - Ducto deferente de um macho de <i>Bothrops alternatus</i> com o aspecto convoluto.	37
Figura 8 - Ilustração das mensurações macroscópicas realizadas nos machos de <i>Bothrops alternatus</i>	38
Figura 9 - Sistema reprodutor de fêmea de <i>Bothrops alternatus</i> . Fragmentos coletados para estudo.....	39
Figura 10 - Fotomicrografia do testículo e do segmento sexual renal de <i>Bothrops alternatus</i> mostrando as medidas microscópicas aferidas.	41
Figura 11 - Fêmea de <i>Bothrops alternatus</i> da região A apresentando folículos imaturos e folículos em desenvolvimento (11 mm). Estação: outono: maturação dos folículos.....	45
Figura 12 - Fêmea de <i>Bothrops alternatus</i> da região A apresentando folículos completamente maduros, prontos para serem ovulados (26,75 mm). Estação: Inverno.	45
Figura 13 - Ciclo reprodutivo de fêmea de <i>Bothrops alternatus</i> da região A	47
Figura 14 - Ciclo reprodutivo de fêmea de <i>Bothrops alternatus</i> da região B	47
Figura 15 - Fertilidade e fecundidade de fêmeas de <i>Bothrops alternatus</i> da região A.....	49
Figura 16 - Fertilidade e fecundidade de fêmeas de <i>Bothrops alternatus</i> da região B.....	49

Figura 17 - Útero aglandular com a musculatura contraída (UMT).....	50
Figura 18 - Representação ao longo dos meses do ano a presença de UMT com ou sem espermatozoide e/ou estocagem no infundíbulo nas fêmeas da região A.	51
Figura 19 - Representação ao longo dos meses do ano a presença de UMT com ou sem espermatozoide e/ou estocagem no infundíbulo nas fêmeas da região B.	52
Figura 20 - Fotomicrografia de cortes transversais do útero aglandular de fêmeas de <i>Bothrops alternatus</i> da região A e B. Estocagem de espermatozoides na região da contorção na musculatura uterina (UMT).	54
Figura 21 - Fotomicrografia de cortes transversais do infundíbulo posterior de fêmeas de <i>Bothrops alternatus</i> da região A e B. Estocagem de espermatozoides nos túbulos ciliados de estocagem de espermatozoides.	55
Figura 22 - Variação sazonal no volume dos testículos (a); diâmetro dos ductos deferentes (b); largura dos rins (c) e comprimento dos rins (d). Machos da Região A.	56
Figura 23 - Variação sazonal no volume dos testículos (a); diâmetro dos ductos deferentes (b); largura dos rins (c) e comprimento dos rins (d). Machos da Região B.	57
Figura 24 - Variação sazonal no diâmetro dos túbulos seminíferos (a); altura do epitélio dos túbulos seminíferos (b); diâmetro dos túbulos do SSR (c) e altura dos epitélios do SSR (d). Machos da Região A.	58
Figura 25 - Variação sazonal no diâmetro dos túbulos seminíferos (a); altura do epitélio dos túbulos seminíferos (b); diâmetro dos túbulos do SSR (c) e altura dos epitélios do SSR (d). Machos da Região B.	59
Figura 26 - Síntese do ciclo reprodutivo de machos da Região A.....	60
Figura 27 - Histologia de corte longitudinal dos túbulos seminíferos dos machos da Região A.....	61
Figura 28 - Histologia de corte longitudinal dos túbulos do segmento sexual renal dos machos da Região A.	61
Figura 29 - Histologia de corte longitudinal dos ductos deferentes dos machos da Região A.....	62

Figura 30 - Síntese do ciclo reprodutivo de machos da Região B.....	63
Figura 31 - Histologia de corte longitudinal dos túbulos seminíferos dos machos da Região B.....	63
Figura 32 - Histologia de corte longitudinal dos túbulos do segmento sexual renal dos machos da Região B	64
Figura 33 - Histologia de corte longitudinal dos ductos deferentes dos machos da Região B.....	65
Figura 34 - Síntese do ciclo das fêmeas e machos de <i>Bothrops alternatus</i> das regiões A e B	66
Figura 35 - Diferença de tamanhos das caudas entre fêmeas e machos de <i>Bothrops alternatus</i>	114
Figura 36 - Histograma da atividade total de serpentes <i>Bothrops alternatus</i> adultas da Região A.	116
Figura 37 - Histograma da atividade total de serpentes <i>Bothrops alternatus</i> adultas da Região B.....	117
Figura 38 - Histograma da atividade total de filhotes de <i>Bothrops alternatus</i> da Região A.....	118
Figura 39 - Histograma da atividade total de filhotes de <i>Bothrops alternatus</i> da Região B.....	118

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	21
2	BIOLOGIA REPRODUTIVA DE FÊMEAS E MACHOS DE URUTU-CRUZEIRO (<i>Bothrops alternatus</i>)	25
2.1	INTRODUÇÃO.....	25
2.2	MATERIAL E MÉTODO.....	30
2.2.1	Coleta de dados e regiões amostradas	30
2.2.2	Amostra para ciclo reprodutivo das fêmeas: dados macroscópicos	33
2.2.3	Amostra para ciclo reprodutivo das fêmeas: dados microscópicos	34
2.2.4	Amostra para ciclo reprodutivo dos machos: dados macroscópicos	37
2.2.5	Amostra para ciclo reprodutivo dos machos: dados microscópicos.....	38
2.2.6	Análises histológicas	41
2.2.7	Análises estatísticas	42
2.3	RESULTADOS	44
2.3.1	Ciclo reprodutivo das fêmeas	44
2.3.2	Fecundidade	48
2.3.3	Estocagem de espermatozoides nas fêmeas	50
2.3.4	Ciclo reprodutivo dos machos	56
2.3.5	Síntese do ciclo de fêmeas e machos	65
2.4	DISCUSSÃO	67
2.5	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICE	90
	ANEXO	95
3	DIMORFISMO SEXUAL, DIFERENÇA DE TAMANHOS INTERPOPULACIONAIS E ATIVIDADE SAZONAL DE <i>Bothrops alternatus</i>	110
3.1	INTRODUÇÃO.....	110
3.2	MATERIAL E MÉTODO.....	111
3.2.1	Coleta de dados	111
3.2.2	Dimorfismo sexual e diferença de tamanhos interpopulacionais.....	112

3.2.3	Atividade	113
3.3	RESULTADOS	113
3.4	DISCUSSÃO	119
3.5	CONCLUSÕES.....	121
	REFERÊNCIAS.....	123
	APÊNDICE	127
4	CONCLUSÕES GERAIS.....	129
	REFERÊNCIAS GERAIS	130

1 INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Bothrops* é um agrupamento monofilético (WÜSTER et al., 2002) pertencente à subfamília Crotalinae, representante exclusiva da família Viperidae no Novo Mundo. Dos gêneros descritos para a América do Sul, *Bothrops* apresenta o maior número de espécies (aproximadamente 40) (CAMPBELL; LAMAR, 1989) agrupadas em seis grupos monofiléticos: *alternatus*, *atrox*, *jararaca*, *jararacussu*, *neuwiedi* e *taeniatus* (SALOMÃO et al., 1997, 1999; PARKINSON et al., 2002; WÜSTER et al., 2002).

Bothrops alternatus (DUMÉRIL; BIBRON; DUMÉRIL, 1854) (Figura 1) pertence ao grupo basal 'alternatus', o qual é composto por *B. ammodytoides*, *B. cotiara*, *B. fonsecai*, *B. itapetiningae* e *B. jonathani* (CARRASCO et al., 2012). Essa serpente é conhecida popularmente no Brasil como urutu cruzeiro, cruzeira, jararaca rabo-de-porco e boicoatiara. Possui cor de fundo dorsal marrom, bronze ou oliváceo. O dorso da cabeça é marrom, variando de chocolate para quase preto. No corpo, apresenta uma série de marcas marrons, que cobre cada lado, e estas se encontram ou se alternam no meio do dorso limitado por uma margem de cor nata ou branca. Frequentemente, o efeito é que a mancha maior tem o formato de um "C" ou de um gancho de telefone (CAMPBELL; LAMAR, 1989).

Figura 1 - Exemplar adulto de uma fêmea da serpente *Bothrops alternatus*

Foto: Fernanda Magno Amaral (2012).

A urutu cruzeiro ocorre no Brasil em florestas de Minas Gerais, no interior de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e no Mato Grosso, ao longo do Rio Paraná e no extremo centro-sul do estado. É também encontrada em todo o Uruguai, sul do Paraguai e no centro e norte da Argentina (CAMPBELL; LAMAR, 1989) (Figura 2). Segundo Mesquita e Brites (2003) essa espécie ocupa principalmente locais úmidos, próximos a rios e córregos, ocorrendo também em áreas de cultura de cana, milho e hortaliças e nas proximidades das sedes de sítios e fazendas, sendo pouco encontrada nas estradas rurais.

Figura 2 - Mapa com a distribuição geográfica (área em vermelho) de *Bothrops alternatus*

Fonte: Adaptado: [http:// google.com.br/maps](http://google.com.br/maps), com base em: (CAMPBELL; LAMAR, 1989).

De acordo com Martins, Marques e Sazima (2002), *B. alternatus* apresenta uma dieta especialista, alimentando-se de mamíferos (80,8% Muridae, 9,6% Caviidae e 9,6% Didelphidae) (NUNES, 2006). Dentre as serpentes do grupo *Bothrops*, a urutu é uma das espécies que não apresentam a ponta da cauda branca na fase juvenil, comportamento pelo qual é frequentemente associado à alimentação de presas ectotérmicas, especialmente de anfíbios anuros, pois a ponta da cauda branca os atrai. Esse fato pode ser consequência da especialização em sua dieta (MARTINS; MARQUES; SAZIMA, 2002).

Essa serpente possui hábitos terrestres, é grande e robusta, com comprimento de aproximadamente 1690 mm, sendo o tamanho mais comum de 1000 mm (CAMPBELL; LAMAR, 1989). Os filhotes também apresentam tamanhos corporais maiores em relação a outras espécies do gênero (146 mm a 252 mm). Essas características estão vinculadas ao hábito alimentar especialista desta serpente (NUNES et al., 2010).

Sobre a biologia reprodutiva de *B. alternatus*, sabe-se que ela se reproduz por viviparidade (NUNES et al., 2010). Entre os vertebrados, viviparidade é o padrão reprodutivo em que as fêmeas retêm os ovos fertilizados no seu oviduto até dar à luz a seus filhotes já formados (BLACKBURN; STEWART, 2011). Isso implica especializações anatômicas e fisiológicas por meio das quais fêmeas grávidas mantêm seus embriões em desenvolvimento. Tais aspectos são mediados por hormônios esteróides sexuais, os quais controlam a função do ovário e do oviduto, bem como as especializações moleculares e bioquímicas associados com a nutrição embrionária e troca gasosa materno-fetal (BLACKBURN, 2006).

A reprodução é um aspecto da biologia de serpentes bem estudado e, portanto, bem conhecido (SEIGEL; FORD, 1987). Ciclos reprodutivos podem ser sazonais ou assazonais e ambos podem apresentar variações (FITCH, 1982; SEIGEL; FORD, 1987). Pelo fato da reprodução possuir uma diversidade de fatores associados (e.g., utilização de habitat, alimentação, temperatura, pluviosidade), o modo reprodutivo vem sendo investigado sob enfoque evolutivo (SHINE, 1985; SEIGEL; FORD, 1987). Entretanto ainda existem inúmeras questões importantes envolvendo estratégias reprodutivas diferenciadas em serpentes a serem

respondidas. Tais questões envolvem principalmente os ciclos das serpentes que habitam regiões tropicais (SEIGEL; FORD, 1987).

Desta forma, este trabalho utilizou análises morfológicas e histológicas para ampliar o conhecimento da biologia reprodutiva de serpentes e caracterizar o ciclo reprodutivo dessa espécie, assim permitindo a compreensão do ciclo anual de fêmeas e machos de *Bothrops alternatus*. Além disso, tendo em vista a ampla distribuição geográfica desta espécie, ocorrendo desde climas mais quentes como os encontrados na mata atlântica e cerrado até regiões mais frias como os pampas e tendo como base a recente teoria de inércia filogenética sugerida por Barros et al. (2012) na reprodução de *Bothrops*, este trabalho analisou a hipótese do ciclo reprodutivo de *Bothrops alternatus* ser mais conservado ou mais plástico devido às variações ambientais.

2 BIOLOGIA REPRODUTIVA DE FÊMEAS E MACHOS DE URUTU CRUZEIRO (*Bothrops alternatus*)

2.1 INTRODUÇÃO

Estratégias reprodutivas podem ser definidas como o conjunto de características manifestadas por uma espécie para alcançar o sucesso reprodutivo de modo a garantir o equilíbrio populacional (VAZZOLER, 1996). Este sucesso tem dependido, em última instância, da adaptação de seus ciclos reprodutivos para ambientes em que eles evoluíram. E em todos os ambientes habitáveis, os animais ali presentes mostraram algum grau de adaptação (e.g. controle do ciclo reprodutivo, produção de prole na época do ano mais vantajosa para a sua sobrevivência, entre outros). Tal controle do ciclo reprodutivo requer que o organismo perceba as mudanças no ambiente, para assim poder adaptar sua fisiologia e apresentar a melhor estratégia para sua reprodução (CALLARD et al., 1978).

Os fatores ambientais como fotoperíodo, temperatura e umidade, além da disponibilidade de alimento, podem ser determinantes nas estratégias reprodutivas apresentadas pelas espécies do gênero *Bothrops* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; SASA; WASKO; LAMAR, 2009; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a). A temperatura em serpentes parece ser um dos fatores mais importantes no período reprodutivo. Um experimento feito por Lutterschmidt e Mason (2009) mostrou que a temperatura, na ausência do fotoperíodo, foi suficiente para modular as concentrações de andrógenos no período reprodutivo.

A gametogênese é uma das ferramentas utilizadas para a classificação dos ciclos reprodutivos. Saint Girons (1982) e Schuett (1992) classificam os ciclos em quatro tipos: Tipo I (pós-nupcial ou dissociado), a produção de gametas ocorre após a cópula (na estação quente) e ocorre estocagem de espermatozoides obrigatoriamente no trato reprodutivo dos machos e/ou das fêmeas; Tipo II (misto), a produção dos gametas é iniciada no final da primavera, é interrompida no inverno e termina somente no ano seguinte; Tipo III (pré-nupcial ou associado), a produção

de gametas coincide ou precede a época de acasalamento; e o Tipo IV (atividade reprodutiva contínua), em que a gametogênese ocorre durante todo o ano.

Mais recentemente, uma nova classificação foi proposta por Mathies (2011), na qual os ciclos são avaliados quanto ao indivíduo e quanto à população. O ciclo a nível individual pode ser classificado em: descontínuo cíclico, no qual as gônadas apresentam regressão total em algum período do ano; contínuo cíclico, não há regressão completa, mas sim uma redução na produção de gametas; e acíclico, onde há produção contínua de gametas. Já a nível populacional, o ciclo descontínuo e contínuo podem ser sazonal sincrônico ou semi-sincrônico (a sincronia entre os indivíduos não é marcadamente fechada), ou pode ser asazonal, quando há ausência de sincronia entre os indivíduos.

Segundo Seigel e Ford (1987), serpentes que habitam zonas temperadas possuem ciclos sazonais sincronizados com estações mais quentes do ano. No entanto, em regiões tropicais, os ciclos podem variar havendo espécies com reprodução sazonal (MARQUES, 1996a; FOWLER et al., 1998; ALMEIDASANTOS et al., 2004; ROJAS, 2009; MUNIZ-DA-SILVA, 2012; MARQUES et al., 2013) e outras consideradas com reprodução contínua (PIZZATTO; MARQUES, 2002; PIZZATTO et al., 2008; OROFINO et al., 2010).

Os ciclos reprodutivos em serpentes fêmeas podem ser caracterizados pela época do crescimento folicular. Em fêmeas imaturas, os ovários apresentam apenas folículos em vitelogênese primária (V1) (PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS; MARQUES, 2005), transparentes ou esbranquiçados, sem deposição de vitelo, menor que 10 mm, em fase quiescente. Nas fêmeas maduras são encontrados folículos em vitelogênese primária e/ou amarelos com deposição de vitelo em fase ativa (vitelogênese secundária – V2), entre 10 a 30 mm à medida que o ciclo reprodutivo avança (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002). Dados do ciclo reprodutivo de fêmeas *B. alternatus* do sul do Brasil indicam que a reprodução é sazonal, com fêmeas apresentando folículos quiescentes (V1), no ovário, em todos os meses do ano, e folículos em fase ativa do desenvolvimento (V2), iniciando o crescimento no final do verão e início de outono (NUNES et al., 2010). Em *Crotalus* e *Bothrops* as fêmeas pós-parto estão em fase quiescente e estarão em fase ativa só na estação seguinte, caracterizando a bienalidade do ciclo (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002).

Em várias espécies de serpentes, o acasalamento não está ligado temporariamente à ovulação e podem ocorrer meses antes desta (SCHUETT, 1992), havendo uma assincronia entre o tempo desses eventos (NUNES et al., 2010). Portanto, os espermatozóides permanecem armazenados no trato reprodutivo da fêmea até ocorrer a fertilização (SCHUETT, 1992). Essa estocagem pode ocorrer por meio da contração na musculatura uterina posterior (UMT), como observada em viperídeos de região tropical (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002) ou por meio de receptáculos seminais (túbulos de estocagem de esperma) presentes no infundíbulo, como em colubrídeos de região temperada (FOX, 1956; SCHUETT, 1992). Almeida-Santos e Salomão (2002) propuseram que UMT é o meio pelo qual o armazenamento de esperma é mantido em serpentes viperidae, atuando como um plug copulatório. Essa região apresenta uma contorção que funciona como um tampão fisiológico. Limitados neste espaço esses espermatozoides permanecem estocados nas dobras do útero e viáveis por todo o inverno ascendendo provavelmente para a região infundibular no final da primavera (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002) quando há um relaxamento da musculatura uterina (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997) e assim ocorrendo à fertilização (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002).

O ciclo reprodutivo em machos de serpentes é inferido pelo aumento do volume testicular, devido à sua atividade espermatogênica, na fase de produção espermática (SCHUETT et al., 2002; KROMER; MARTINEZ; MASON, 2004). Segundo Volsoe (1944) existem espécies que podem sofrer alterações morfológicas cíclicas em regiões diferentes de seus órgãos reprodutores, principalmente de natureza histológica e citológica, mas também podem ocorrer mudanças com relação ao formato e tamanho do órgão. Mas não é totalmente seguro traçar o ciclo reprodutivos dos machos baseando-se somente em dados macroscópicos do volume dos testículos. Portanto, também se faz necessário a análise microscópica deste órgão, para assim realizar o estudo dos túbulos seminíferos e caracterizar com precisão as etapas da ciclicidade testicular por meio das mudanças epiteliais nestes túbulos (MATHIES, 2011).

A maturidade dos machos, geralmente é analisada macroscopicamente por meio dos ductos deferentes, os quais são opacos e convolutos quando maduros (SHINE, 1977). De forma semelhante às fêmeas, machos de várias espécies de

serpentes podem estocar esperma até o acasalamento nas vias genitais (e.g., epidídimos ou ductos deferentes). Esses machos podem apresentar um padrão reprodutivo “dissociado”, acasalando na época em que os testículos estão inativos (CLESSON et al., 2002; SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2002).

Outro dado importante a ser tomado no momento de se estudar reprodução é o ciclo do segmento sexual renal (SSR). O SSR é uma estrutura presente no nefrón de alguns répteis como é o caso dos Squamata (REGAURD; POLICARD, 1903; VOLSOE, 1944), porém ausente em quelônios e crocodilianos (FOX, 1952).

O SSR é uma estrutura caracterizada por um epitélio simples, constituído de células colunares com núcleo basal e a presença de grânulos sexuais espalhados por todo o citoplasma (SEVER et al., 2002; KROMER et al., 2004). O número e a densidade desses grânulos no citoplasma variam significativamente dependendo do status espermatogênico e hormonal, assim como da espécie envolvida. A atividade testicular, geralmente é concomitante com o aumento do segmento sexual renal durante a época reprodutiva e assim havendo uma associação direta com a cópula (SCHUETT et al., 2002; SEVER et al., 2002). Isso se deve ao fato dessa estrutura está sob controle do hormônio testosterona (SCHUETT et al., 2002; KROMER et al., 2004).

A função do segmento sexual renal ainda não é tão bem conhecida, porém há hipóteses que o SSR participa no processo de sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino (ALDRIDGE et al., 2011). Já nas fêmeas de serpentes não ocorre a hipertrofia do SSR na época reprodutiva (KROMER; MARTINEZ; MASON, 2004).

Portanto, para se esclarecer o ciclo reprodutivo masculino de Squamata é imprescindível considerar a atividade secretória do segmento sexual renal (SEVER et al., 2002) e correlacioná-lo ao ciclo espermatogênico.

Apesar do grande avanço dos estudos sobre reprodução das jararacas neotropicais, há uma defasagem de informações sobre algumas espécies, uma vez que o gênero *Bothrops* compreende cerca de 50 espécies distribuídas na América do Sul e Central (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

Pouco são os estudos sobre a reprodução da espécie *Bothrops alternatus*. A maioria trabalhos de comportamento reprodutivo com esta espécie abordam apenas alguns aspectos do ciclo, como época de nascimentos, cópula e gestação, podendo ainda ser descritos de forma contraditória por serem norteados apenas por dados de exemplares de cativeiro (exceto NUNES et al., 2010, que também utilizou dados de animais de natureza). Segundo Nunes (2006) esses dados de comportamento reprodutivo em cativeiro não são precisos em função da influência de diferentes condições ambientais, como a temperatura, por exemplo, que são mantidas relativamente constantes nestes locais. Devido a esse fato, o período de gestação dessas serpentes pode ser superestimado, pois após a cópula muitas espécies de *Bothrops* podem estocar esperma no oviduto, assim, existindo divergências entre alguns autores.

O conhecimento e a caracterização da biologia reprodutiva dessa espécie, com análises histológicas e morfológicas do ciclo vitelogênico, período gestacional, parturição, período de cópula, ciclo espermatogênico e do SSR permitirá a compreensão do ciclo reprodutivo anual de fêmeas e machos. Além disso, informações da existência de estocagem de esperma, são importantes e úteis para estudos realizados com reprodução em Viperídeos e pode ser um importante fator adicional na análise das questões filogenéticas dos grupos de serpentes (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; ECKSTUT et al., 2009).

Correlações entre estratégias reprodutivas e diferentes fatores ambientais, são fundamentais para explicações adaptativas na diversidade dos eventos reprodutivos em serpentes (VITT, 1992; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; PIZZATTO; MARQUES, 2007). Além disso, comparações intraespecíficas com populações ocupando diferentes locais, assim reduzindo a influência filogenética, poderia ser uma chave nos estudos de plasticidade ou conservado filogenético na reprodução.

Com isso este trabalho teve como objetivo descrever os ciclos reprodutivos de fêmeas e machos da espécie *Bothrops alternatus*, assim como comparar dados reprodutivos de diferentes populações que habitam diferentes regiões climáticas do Brasil. Como também, determinar se há influências de fatores ambientais, tais como temperatura e pluviosidade, atuando nos eventos reprodutivos desta espécie.

2.2 MATERIAL E MÉTODO

2.2.1 Coleta de dados e regiões amostradas

A pesquisa foi realizada com base em análises de espécimes fixadas e tombadas nas seguintes coleções herpetológicas do Brasil: Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG), Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Museu de Ciências Naturais da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Instituto Vital Brasil (IVB), Instituto Butantan (IB), Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ), Universidade de Brasília (UNB), Coleção de Herpetologia da Universidade Federal de Santa Maria (ZUFSM), Universidade de Passo Fundo (UPF) e Coleção de Répteis do Museu de Ciências Naturais (FZBRS) (Apêndice A).

Para a caracterização das possíveis influências dos fatores ambientais no ciclo reprodutivo das fêmeas de *B. alternatus*, as populações foram divididas em duas: região A: serpentes que habitam o centro-oeste e sudeste do Brasil; e região B: serpentes da região sul do Brasil. Para elaborar essa divisão foram confeccionados climatogramas das regiões onde as serpentes foram coletadas (Figura 3). Utilizou-se o programa DIVA-GIS 7.1.7, a partir da base de dados WorldClim (clima atual: 1950-2000), versão 1.3 de outubro de 2004, resolução de 10 minutos.

De maneira geral, as áreas localizadas dentro do domínio aqui denominado de região A (Apêndice B), possuem clima tropical, com médias de temperatura entre 15,6°C e 27,8°C ao longo do ano e regime de chuvas bem marcadas: outubro a março, estação chuvosa, e abril a setembro, estação seca (Figuras 4 A e B). Já as áreas localizadas na região B (Apêndice B), possuem clima temperado, com médias de temperatura entre 13,8°C e 23,9°C e com regimes de chuvas constantes ao longo do ano (Figura 4 C).

Considerou-se o ano dividido em estações. O verão correspondendo aos dias entre 22 de dezembro a 19 de março; o outono dos dias 20 de março a 19 de junho; o inverno dos dias entre 20 de junho a 21 de setembro; e a primavera, os dias 22 de setembro a 21 de dezembro (de acordo com o centro de Previsões de Tempo e Estudos Climáticos do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – CEPETEC/INPE).

Figura 3 - Distribuição geográfica dos espécimes analisados (pontos em vermelho)

Fonte: Fernanda Magno Amaral (2015).

Figura 4 - Caracterização climática das regiões amostradas. Médias históricas (1950-2000) de temperaturas máximas (linha vermelha), mínima (linha azul) e pluviosidade (barras)

Legenda: Climatogramas A e B = região A e Climatograma C = região B.

Fonte: Fernanda Magno Amaral (2015).

2.2.2 Amostra para ciclo reprodutivo das fêmeas: dados macroscópicos

A amostra foi composta por 41 serpentes fêmeas adultas da região A e 48 serpentes fêmeas adultas da região B. Também foram analisadas 44 serpentes jovens para estudos de maturidade sexual.

Foram coletados de todos os indivíduos dados como: 1) procedência; 2) data de óbito dos espécimes; 3) comprimento rostro cloacal (CRC); 4) comprimento da cauda (CC).

Em seguida foi realizada incisão ventral ao longo de dois terços posteriores do corpo para a coleta de dados do sistema reprodutor e órgãos relacionados. As medidas do CRC de todas as serpentes foram aferidas com auxílio de uma fita métrica métrica de acurácia de 2000 mm. E as demais mensurações utilizou-se paquímetro digital com precisão de 0,1 mm.

Foram consideradas fêmeas maduras aquelas que apresentavam folículo em vitelogênese secundária, ovo ou embriões no oviduto, ou oviduto distendido indicando a condição pós-parto (ALDRIDGE, 1979; ALMEIDA-SANTOS, 2005). A menor fêmea madura apresentava 650 mm (região A) e 640 mm (região B), inferior a este tamanho nenhuma se encontrava madura ainda.

Para a caracterização do ciclo reprodutivo das fêmeas de *B. alternatus* foi considerado o tamanho dos folículos presentes no ovário e/ou ovos e embriões presentes no oviduto. Os dados macroscópicos registrados para as fêmeas foram: 1) número de folículo em vitelogênese primária e vitelogênese secundária; 2) número de ovos ou embriões presentes no oviduto; 3) diâmetro do maior folículo ou ovo (Figura 5); 3) presença/ausência de contração da musculatura uterina (UMT); 4) presença/ausência de embriões e seu estágio de desenvolvimento; 5) aspecto geral dos ovidutos (distendido/liso).

Figura 5 - Mensuração do diâmetro do maior folículo no ovário.
Folículo em vitelogênese secundária

Foto: Fernanda Magno Amaral (2015).

O padrão de fecundidade foi analisado e estimado por meio da contagem do número de folículos em vitelogênese secundária em estágio avançado de desenvolvimento (> 20 mm) no ovário, de embriões presentes no oviduto e de filhotes recém-paridos. Assim como, em uma outra contagem separada, foi estimada o potencial de fecundidade por meio do número dos folículos em vitelogênese primária presentes no ovário. Para padronização das amostras foi analisado somente o lado direito dos ovidutos e ovários das fêmeas.

Em relação ao estágio de desenvolvimento dos embriões, foi possível caracterizá-los em três fases: fase 1: muito vitelo e um pequeno embrião visível, provável fecundação recente; fase 2: o vitelo ainda é abundante, embrião mais visível; fase 3: embrião em estágio avançado de desenvolvimento e com pouco ou nenhum vitelo aparente (PIZZATTO; MARQUES, 2007).

As fotografias foram obtidas utilizando-se máquina fotográfica digital Canon SX30 IS. E utilizou-se o programa Photoshop 7.0 para edição de imagens.

2.2.3 Amostra para ciclo reprodutivo das fêmeas: dados microscópicos

Além dos dados morfológicos, foram coletados fragmentos de aproximadamente 1 centímetro de comprimento das gônadas para análise

histológica (Figura 6). Foram coletados: infundíbulo anterior e posterior, útero glandular e não glandular e bolsa vaginal. A finalidade da coleta dessas gônadas foi identificar mudanças morfofuncionais tal como o UMT, identificar receptáculos ou túbulos de estocagem de esperma, detectar a presença de espermatozoides no trato reprodutor feminino e assim, juntamente com os dados macroscópicos, auxiliar na determinação da época de acasalamento, ovulação e fertilização.

Para padronização das amostras e análises, somente fragmentos das gônadas do lado direito foram coletadas.

Figura 6 - Sistema reprodutor de fêmea de *Bothrops alternatus*. Fragmentos coletados para estudo

Legenda: Ovário (Ov); Folículo (Fl); Infundíbulo anterior (Ia); Infundíbulo posterior (Ip); Útero glandular (Ug); Útero não glandular (Ung); Bolsa vaginal (Bv).
Foto: Fernanda Magno Amaral (2015).

2.2.4 Amostra para ciclo reprodutivo dos machos: dados macroscópicos

A amostra foi composta por 33 serpentes machos adultos da região A e 34 serpentes fêmeas adultas da região B. Também foram analisadas 32 serpentes jovens para estudos de maturidade sexual.

Foram coletados de todos os indivíduos dados como: 1) procedência; 2) data de óbito dos espécimes; 3) comprimento rostro cloacal (CRC); 4) comprimento da cauda (CC).

Em seguida foi realizada incisão ventral ao longo de dois terços posteriores do corpo para a coleta de dados do sistema reprodutor e órgãos relacionados. As medidas do CRC de todas as serpentes foram aferidas com auxílio de uma fita métrica de acurácia de 2000 mm. E as demais mensurações utilizou-se paquímetro digital com precisão de 0,1 mm.

Foi considerado macho maduro aquele que apresentava o ducto deferente opaco e convoluto (SHINE, 1977; ALMEIDA-SANTOS, 2005; ALMEIDA-SANTOA, 2014) (Figura 7), além de análises histológicas para a confirmação de produção de espermatozóides. O menor macho maduro apresentava 419 mm (região A) e 422 mm (região B).

Figura 7 - Ducto deferente de um macho de *Bothrops alternatus* com o aspecto convoluto

Legenda: Rim (**Rm**); ducto deferente (**Dd**); cloaca (**Cl**).
Foto: Fernanda Magno Amaral (2014).

Para a caracterização do ciclo reprodutivo dos machos de *B. alternatus* foram coletados os seguintes dados morfológicos: (1) comprimento (a), largura (b) e espessura (c) do testículo direito, visando a determinação do volume testicular, que possui formato elipsoidal, por meio da fórmula do volume elipsóide: $4/3 \cdot \pi \cdot a \cdot b \cdot c$, onde $a = \frac{1}{2}$ do comprimento, $b = \frac{1}{2}$ da largura e $c = \frac{1}{2}$ espessura (PLEGUEZUELOS; FERICHE, 1999). (2) largura da região distal do ducto deferente e seu aspecto (liso ou convoluto). (3) comprimento total do rim e a largura da região cranial desse órgão (Figura 8).

Esses dados foram tomados a fim de analisar possível hipertrofia dos testículos e do segmento sexual renal em épocas reprodutivas e estocagem de espermatozoides nos ductos deferentes.

Todos os dados foram mensurados somente do lado direito com a finalidade de padronização.

Figura 8 - Ilustração das mensurações macroscópicas realizadas nos machos de *Bothrops alternatus*

Legenda: Testículo (Te); Ducto deferente (Dd); Rim (Rm). A- comprimento do testículo; B- largura do ducto deferente; C- largura do rim. Fotos: Fernanda Magno Amaral (2015).

2.2.5 Amostra para ciclo reprodutivo dos machos: dados microscópicos

Além dos dados morfológicos, foram coletados fragmentos de aproximadamente 1 centímetro de comprimento das gônadas para análise histológica. Foram coletados: – testículo; ducto deferente, porção mais distal; e rim, porção mais cranial (Figura 9).

As análises histológicas dos testículos servirão para caracterizar o ciclo espermatogênico por meio de mudanças sazonais, as quais envolvem uma série de modificações nucleares e citoplasmáticas que resultam nos espermatozoides, assim como a estocagem espermática ao longo do ano nos ductos deferentes. Os estágios do ciclo espermatogênico serão determinados e classificados de 1 a 6, de acordo com a terminologia proposta por Goldberg e Parker (1975), Schuett et al. (2002) (adaptado) (Quadro 1). Além disso, o segmento sexual renal será analisado quanto à sua hipertrofia.

Figura 9 - Sistema reprodutor de fêmea de *Bothrops alternatus*. Fragmentos coletados para estudo

Legenda: Testículo (Te); Ducto deferente (Dd); Rim (Rm).

Foto: Fernanda Magno Amaral (2015).

Quadro 1 - Classificação dos estágios testiculares

Estágios	Descrição dos túbulos seminíferos
1	Regressão completa: túbulos seminíferos somente com poucas espermatogônias e células de Sertoli; podem ter poucos espermatozoides na luz do lúmen.
2	Início da recrudescência: espermatogônias aumentando e dividindo-se e presença de espermátocitos primários.
3	Início da espermiogênese: espermátides em metamorfose com poucos espermatozoides no lúmen
4	Pico da espermiogênese: espermatozoides maduros no lúmen
5	Início da regressão: espermatozoides abundantes no lúmen, espermátocitos muito reduzidos, espermátides reduzidas, porém algumas ainda em transformação.
6	Regressão avançada: epitélio germinal reduzido, com poucas espermatogônias, espermátocitos e espermátides; podem conter ou não espermatozoides no lúmen de uma a duas camadas de células.

Fonte: Adaptado de (GOLDBERG; PARKER, 1975; MCPHERSON; MARION, 1981; SAINT-GIRONS, 1982; ROJAS et al., 2013)

Mudanças estruturais poderão ser determinadas pela variação (μm) no diâmetro dos túbulos e altura do epitélio (KROMERK et al., 2004; GRAHAM, 2006). Desta forma, foram aferidas medidas morfométricas com o auxílio do programa ImageJ version 1.46 (RASBAND, 2011). Para cada animal, levando em consideração somente o testículo e o rim, foram obtidas de seis a dez medidas a fim de se obter uma média para cada variável. Do testículo, as medidas obtidas foram: o diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio seminífero (Figura 10 A). Do rim foram registradas as medidas do segmento sexual renal: diâmetro dos túbulos e altura do epitélio (Figura 10 B).

Figura 10 - Fotomicrografia do testículo e do segmento sexual renal de *Bothrops alternatus* mostrando as medidas microscópicas aferidas

Legenda: **A** - Corte transversal. Diâmetro do túbulo seminífero (**a**); altura do epitélio seminífero (**b**); Lúmen (**Lm**). Hematoxilina-eosina, 40X. **B** - Corte transversal. Diâmetro do túbulo do SSR (**a**); altura do epitélio do SSR (**b**); Lúmen (**Lm**). Hematoxilina-eosina, 20X.

Fotos: Fernanda Magno Amaral (2015).

2.2.6 Análises histológicas

Essas amostras de tecido foram processadas para microscopia de luz (M.L.), pelo método de Parafina. O material foi desidratado em uma série crescente de

etanol, de 70% a 100% e diafanizados em xilol, seguida da inclusão em paraplast ou parafina. Logo foi feita a trimagem dos blocos e a obtenção de cortes (micrótomo Leica RM 2035) de 5 µm de espessura. Os cortes foram corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (H/E) (JUNQUEIRA et al., 1979) para o estudo geral dos tecidos.

As imagens das lâminas histológicas foram capturadas por meio do microscópio Olympus BX51, utilizando-se o sistema fotográfico e a análise morfométrica do programa Image-Pro Express Olympus.

2.2.7 Análises estatísticas

As análises foram realizadas utilizando-se testes paramétricos ou o similar não paramétrico dependendo da natureza dos dados. As análises foram baseadas em Zar (1999) e as diferenças consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Antes da análise estatística todas as amostras foram testadas quanto à distribuição dos dados pelos testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov e homogeneidade utilizando o software Instat.

A relação entre o comprimento rostro-cloacal da fêmea e o número de folículos vitelogênicos e embriões foi investigado por regressão linear, tendo o CRC como variável independente. Comparações interpopulacionais na fecundidade foram realizadas com ANCOVA, tendo como covariável o CRC materno.

Todos os dados referentes aos órgãos e tecidos das serpentes foram submetidos a teste de Correlação de Pearson com os dados de CRC, com a finalidade de identificar correlação das medidas desses órgãos e tecidos com o tamanho do animal.

Diferenças no volume dos testículos, diâmetro dos ductos deferentes e largura dos rins ao longo do ano, dos machos da região A, foram testadas utilizando-se análise de variância (ANOVA). Isso porque análises preliminares

indicaram que não houve correlação entre essas variáveis com o comprimento rostro-cloacal (CRC). Volume dos testículos ($r = 0,0735$; $P = 0,6565$), diâmetros dos ductos deferentes ($r = 0,0421$; $P = 0,7990$) e a largura dos rins ($r = 0,1258$; $P = 0,4455$). A única variável que foi testada utilizando-se a análise de covariância (ANCOVA) foi o comprimento dos rins, pois apresentou correlação com o CRC ($r = 0,4513$; $P = 0,0051$). Para as variáveis dos machos da região B, as amostras foram testadas estatisticamente por análises de variância (ANOVA), por não apresentarem correlação com o CRC: Volume dos testículos ($r = 0,1840$; $P = 0,2899$), diâmetro dos ductos deferentes ($r = 0,1386$; $P = 0,4272$); largura dos rins ($r = 0,1788$; $P = 0,3041$); comprimento dos rins ($r = 0,3090$; $P = 0,0709$).

Já para a análise dos dados microscópicos, para machos da região A, os dados de diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio seminífero foram testados utilizando-se análise de covariância (ANCOVA) por haver correlação com o CRC ($r = 0,4489$; $P = 0,0471$; $r = 0,5159$; $P = 0,0199$, respectivamente). E o diâmetro dos túbulos do SSR e altura do epitélio do SSR foram testados segundo a análise de variância (ANOVA), pois não houve correlação com o CRC ($r = 0,0154$; $P = 0,9473$; $r = 0,0728$; $P = 0,7538$, respectivamente). Para os machos da região B todas as variáveis foram submetidas a análises de covariância (ANCOVA), pois não apresentaram correlação com o CRC: diâmetro do epitélio dos túbulos seminíferos ($r = 0,2055$; $P = 0,3590$); altura do epitélio dos túbulos seminíferos ($r = 0,1487$; $P = 0,5090$); diâmetro dos túbulos do SSR ($r = 0,1784$; $P = 0,4271$); altura do epitélio do SSR ($r = 0,0954$; $P = 0,6728$).

Os gráficos para essas amostras foram elaborados a partir dos resíduos da regressão linear entre cada uma das variáveis e o CRC. Os resíduos foram utilizados para eliminar a influência do tamanho do corpo sobre as variáveis de interesse ao longo das estações (MARQUES et al., 2006). Em caso de diferenças significativas as amostras foram analisadas, posteriormente, pelo teste Post-hoc Tukey de comparações múltiplas.

Todas as análises foram executadas no programa Statistica (STATSOFT, 2007) e no programa Instat, as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Os gráficos foram elaborados nos softwares Microsoft Office Excel 2007 e Statistica 7.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Ciclo reprodutivo das fêmeas

As fêmeas da região A apresentaram, no ovário, folículos quiescentes (vitelogênese primária - V1) em todos os meses do ano. Já os folículos ativos (vitelogênese secundária - V2), foram encontrados no verão, outono e no inverno (Figuras 11 e 12). Em uma fêmea foi observado ovos atrésicos no útero, sendo reabsorvidos, no mês de março (verão). Fêmeas prenhes foram encontradas ao longo da primavera e verão, em setembro (final do verão início de primavera; estágio=2), novembro (estágio=2), dezembro (estágio=3) e janeiro (estágio=3). Estas duas últimas fêmeas prenhes apresentavam embriões ectópicos (Anexo A).

Nascimentos de filhotes foram registrados em janeiro (uma ninhada com 16 filhotes), em fevereiro (uma ninhada com três filhotes) e em maio (uma ninhada com 15 filhotes). Duas outras parturições em natureza, uma em março e outra em abril (dados secundários, Leitão-de-Araújo; Perazzolo, 1974). Em cativeiro foi observada somente uma cópula no mês de junho e na natureza uma cópula em junho e outra em julho (dados secundários, Leitão-de-Araújo e Perazzolo, 1974) (Figura 13).

Figura 11 - Fêmea de *Bothrops alternatus* da região A apresentando folículos imaturos e folículos em desenvolvimento (11 mm). Estação: outono: maturação dos folículos

Legenda: Folículo em vitelogênese secundária (V2); Folículo em vitelogênese primária (V1); Ovário direito (Od); Ovário esquerdo (Oe).

Foto: Fernanda Magno Amaral (2014).

Figura 12 - Fêmea de *Bothrops alternatus* da região A apresentando folículos completamente maduros, prontos para serem ovulados (26,75 mm). Estação: Inverno

Legenda: Folículo em vitelogênese secundária (V2).

Foto: Fernanda Magno Amaral (2014).

As fêmeas da região B possuem folículos em vitelogênese primária todos os meses do ano. Os folículos em vitelogênese secundária, foram encontrados de janeiro a novembro. No entanto, um aumento substancial na atividade vitelogênica (folículos > 20 mm) foi observado no inverno e na primavera, época que antecede ou coincide com a ovulação. Foram observados no mês de novembro (primavera) ovos presentes no útero, recém ovulados (pois ainda existia folículos em V2 no ovário próximo ao infundíbulo), indicando a época de ovulação. Fêmeas prenhes foram encontradas ao longo da primavera e verão, outubro (n=2, estágio=2), novembro (n=2, estágio=2) e janeiro (n=1, estágio=2).

Nascimentos de filhotes foram registrados durante verão e outono, uma média de 10 filhotes por ninhada, e somente uma parturição no inverno. Dados secundários (Nunes et. al. 2010) mostram que houve cópula, em cativeiro, no mês de julho e um pico de parturição em março (Figura 14).

Contudo, houve uma diferença na proporção de fêmeas reprodutivas entre as regiões A e B. Houve um maior número de fêmeas com folículos em vitelogênese secundária (dentre 41 fêmeas na região A, 6 estavam reprodutivas, e dentre 48 fêmeas da região B, 21 estavam reprodutivas). Assim como, maior número de nascimentos de filhotes relatados (região A = 5 ninhadas e região B = mais de 17 ninhadas).

Figura 13 - Ciclo reprodutivo de fêmea de *Bothrops alternatus* da região A

Figura 14 - Ciclo reprodutivo de fêmea de *Bothrops alternatus* da região B

Fonte: Fernanda Magno Amaral (2015).

Comparando-se o ciclo reprodutivo das fêmeas, pôde-se notar que ambos são sazonais. Além disso, o desenvolvimento folicular das fêmeas da região A e região B tem início no verão e os folículos atingem maiores tamanhos no inverno, onde, na estação seguinte, ocorre a ovulação. Portanto, estes ciclos não são plásticos, apresentando, assim, um conservatismo filogenético.

2.3.2 Fecundidade

A fecundidade em potencial, levando em consideração somente os folículos em vitelogênese primária (V1), as fêmeas da região A apresentaram uma correlação positiva em relação ao tamanho do corpo ($r = 0,27$; $P = 0,0011$; $n = 34$) (Figura 15). Contudo para a região B não houve a mesma correlação ($r = 0,24$; $p = 0,1264$; $n = 42$) (Figura 16).

Já a fecundidade em relação ao número de folículos em vitelogênese secundária (V2) em estágio avançado, embriões e filhotes recém-nascidos foi positiva e significativamente relacionada com o comprimento do corpo das fêmeas, tanto da região A ($r = 0,7094$ e $P = 0,0323$) quanto da região B ($r = 0,4827$ e $P = 0,0582$) (Figuras 15 e 16).

Em relação à comparação de número de filhotes entre as fêmeas da região A e da região B não foi significativa ($t = 0,06981$, $gl = 27$, $P = 0,9449$). A média da ninhada da região A são 11 filhotes/ninhada e da região B 10,8 filhotes/ninhada.

Figura 15 - Fecundidade de fêmeas de *Bothrops alternatus* da região A

Legenda: círculo preto fechado: folículos em vitelogênese primária; círculo aberto: folículos em vitelogênese secundária; círculo vermelho: filhotes recém-nascidos; círculo verde: embriões no oviduto; linha: representa a tendência.

Fonte: Fernanda Magno Amaral (2015).

Figura 16 - Fecundidade de fêmeas de *Bothrops alternatus* da região B

Legenda: círculo preto fechado: folículos em vitelogênese primária; círculo aberto: folículos em vitelogênese secundária; círculo verde: embriões no oviduto; linha: representa a tendência.

Fonte: Fernanda Magno Amaral (2015).

2.3.3 Estocagem de espermatozoides

A contração da musculatura uterina (UMT; Figura 17), dentre 41 fêmeas da região A, foi observada em 12 destas ($n = 5$ vitelogênese primária (V1); $n = 5$ vitelogênese secundária (V2); $n = 2$ prenhes). No entanto, espermatozoides agregados nos sulcos da região uterina foram encontrados somente em uma fêmea vitelogênica (V2) (Quadro 2 e Figura 18).

E nas fêmeas da região B, dentre 48, foi observado em 22 delas a presença do UMT ($n = 15$ vitelogênese primária (V1); $n = 5$ vitelogênese secundária (V2); $n = 2$ prenhes). Dentre essas fêmeas, 8 delas possuía espermatozoides presentes somente nos sulcos da região uterina aglandular, 2 apresentavam espermatozoides nos sulcos da região uterina aglandular e nos túbulos de estocagem do infundíbulo (Figuras 20 e 21). E somente uma fêmea que não possuía o UMT e nem espermatozoides no útero aglandular, apresentou estocagem de espermatozoides nos receptáculos de estocagem presentes no infundíbulo (Quadro 3 e Figura 19)

Figura 17 - Útero aglandular com a musculatura contraída (UMT)

Legenda: Contorção na musculatura uterina (UMT); Bolsa vaginal (Bv); Papila urogenital (Pu); Cloaca (Cl).

Foto: Fernanda Magno Amaral (2013).

Figura 18 - Representação ao longo dos meses do ano a presença de UMT com ou sem espermatozoide e/ou estocagem no infundíbulo nas fêmeas da região A

Legenda: Linha 2 (triângulo azul) = UMT com presença de espermatozoides; Linha 3 (triângulo amarelo) = UMT sem a presença de espermatozoides.

Fonte: Fernanda Magno Amaral (2015).

Quadro 2 - Fêmeas da região A que apresentam espermatozoides no UMT e/ou Infundíbulo. Sptz = espermatozoide

(continua)

Data	Estação	Vitelogênese/ Embriões	Presença de UMT	Sptz no UMT	Sptz no Infundíbulo
15/04	outono	Secundária	sim	sim	Não
08/11	primavera	Prenhe	sim	não	Não
01/02	verão	Secundária	sim	não	Não
16/03	verão	Secundária	sim	não	Não
31/12	verão	Primária	sim	não	Não
23/01	verão	Primária	sim	não	Não
02/05	outono	Secundária	sim	não	Não
30/03	outono	Primária	sim	não	não
11/04	outono	Primária	sim	não	não

(Conclusão)

Data	Estação	Vitelogênese/ Embriões	Presença de UMT	Sptz no UMT	Sptz no Infundíbulo
29/05	outono	Primária	sim	não	não
24/07	inverno	Secundária	sim	não	não
13/12	primavera	Prenhe	sim	não	não

Fonte: Fernanda Magno Amaral (2015).

Figura 19 - Representação ao longo dos meses do ano a presença de UMT com ou sem espermatozoide e/ou estocagem no infundíbulo nas fêmeas da região B

Legenda: Linha 1 (triângulo vermelho) = infundíbulo com estocagem de espermatozoides; Linha 2 (triângulo azul) = UMT com presença de espermatozoides; Linha 3 (triângulo amarelo) = UMT sem a presença de espermatozoides; Linha 4 (triângulo roxo) = UMT com presença de espermatozoides e infundíbulo com estocagem de espermatozoides.

Fonte: Fernanda Magno Amaral (2015).

Quadro 3 - Fêmeas da região B que apresentam espermatozoides no UMT e/ou Infundíbulo. Sptz = espermatozoide

(Continua)

Data	Estação	Vitelogênese/ Embriões	Presença de UMT	Sptz no UMT	Sptz no Infundíbulo
07/03	verão	Primária	Sim	sim	não
01/05	outono	Primária	Sim	sim	não
25/08	inverno	Secundária	Sim	sim	sim
20/11	primavera	Primária	Sim	sim	não
12/08	inverno	Secundária	Sim	sim	não
25/08	inverno	Primária	Sim	não	não
25/11	primavera	Prenhe	Sim	não	não
15/05	outono	Primária	Sim	não	não
28/11	primavera	Primária	Sim	sim	não
09/08	inverno	Secundária	Sim	sim	Sim
04/11	primavera	Prenhe	Sim	não	não
04/07	inverno	Secundária	Sim	não	não
13/09	inverno	Secundária	Sim	não	sim
27/08	inverno	Primária	Sim	sim	não
08/05	outono	Primária	Sim	sim	não
11/05	outono	Primária	Sim	sim	não
01/12	primavera	Primária	Sim	não	não
15/05	outono	Primária	Sim	não	não
01/01	verão	Primária	Sim	não	não

(Conclusão)

Data	Estação	Vitelogênese/ Embrões	Presença de UMT	Sptz no UMT	Sptz no Infundíbulo
01/10	primavera	Primária	Não	não	sim
15/04	outono	Primária	Sim	não	não
15/12	primavera	Primária	Sim	não	não

Fonte: Fernanda Magno Amaral (2015).

Figura 20 - Fotomicrografia de cortes transversais do útero aglandular de fêmeas de *Bothrops alternatus* da região A e B. Estocagem de espermatozoides na região da contorção na musculatura uterina (UMT)

Legenda: Espermatozoides (**sptz**), epitélio uterino (**ep**), lúmen (**Lm**).
Fotos: Fernanda Magno Amaral (2015).

Figura 21 - Fotomicrografia de cortes transversais do infundíbulo posterior de fêmeas de *Bothrops alternatus* da região A e B. Estocagem de espermatozoides nos túbulos ciliados de estocagem de espermatozoides

Legenda: Espermatozoides (**sptz**); receptáculos de estocagem de espermatozoides (**seta**).
Fotos: Fernanda Magno Amaral (2015).

2.3 Ciclo reprodutivo dos machos

Dentre os machos da Região A não houve variação entre as estações no volume dos testículos ($F_{(3,35)} = 2,4409$; $P = 0,08061$), no diâmetro dos ductos deferentes ($F_{(3,35)} = 1,4251$; $P = 0,25190$), na largura da região cranial dos rins ($F_{(3,35)} = 1,3762$; $P = 0,26612$) e nem no comprimento dos rins ($F_{(3,32)} = 0,83055$; $P = 0,48694$) (Figura 22).

Entretanto também não houve variação entre as estações do ano nas seguintes variáveis dos machos da Região B: volume dos testículos ($F_{(3,31)} = 2,2775$; $P = 0,09913$), diâmetro dos ductos deferentes ($F_{(3,31)} = 1,6959$; $P = 0,18825$), comprimento dos rins ($F_{(3,31)} = 0,41786$; $P = 0,74142$). Somente a largura dos rins variou ($F_{(3,31)} = 6,4009$; $P = 0,00167$). Testes a posteriori revelaram que o comprimento dos rins é maior no outono (Figura 23).

Figura 22 - Variação sazonal no volume dos testículos (a); diâmetro dos ductos deferentes (b); largura dos rins (c) e comprimento dos rins (d). Machos da Região A

Legenda: Linhas horizontais no interior das caixas representam valores médios, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os valores mínimos e máximos observados.

Fonte: Fernanda Magno Amaral (2015).

Figura 23 - Variação sazonal no volume dos testículos (a); diâmetro dos ductos deferentes (b); largura dos rins (c) e comprimento dos rins (d). Machos da Região B

Legenda: Linhas horizontais no interior das caixas representam valores médios, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os valores mínimos e máximos observados.

Fonte: Fernanda Magno Amaral (2015).

Para as variáveis microscópicas, dentre os machos da Região A, somente os dados do SSR obtiveram diferenças significativas (diâmetro dos túbulos do SSR: $F_{(3,17)} = 4,7360$; $P = 0,01405$; altura do epitélio do SSR: $F_{(3,17)} = 4,6489$; $P = 0,01502$). Para os dados dos túbulos seminíferos o valor de P não foi significativo (diâmetro dos túbulos seminíferos: $F_{(3,15)} = 1,7763$; $P = 0,19480$; altura dos túbulos seminíferos: $F_{(3,15)} = 2,5762$; $P = 0,09252$), mas análises com o teste de Tukey, a posteriori, indicou diferenças significativas entre os tamanhos: diâmetro dos túbulos seminíferos, maiores diâmetros no outono e menores na primavera; altura do epitélio dos túbulos seminíferos, maiores alturas no verão e outono e menores na primavera (Figura 24).

Já para os machos da Região B, somente os dados da altura do epitélio do SSR não possuiu diferença significativa nos valores ($F_{(3,18)} = 2,5357$; $P = 0,08918$), para as outras variáveis houve diferença significativa (diâmetro dos túbulos seminíferos: $F_{(3,18)} = 5,7898$; $P = 0,00594$; altura do epitélio dos túbulos seminíferos: $F_{(3,18)} = 10,265$; $P = 0,00036$; diâmetro dos túbulos do SSR: $F_{(3,18)} = 5,8403$; $P = 0,00572$) (Figura 25).

Figura 24 - Variação sazonal no diâmetro do túbulos seminíferos (a); altura do epitélio dos túbulos seminíferos (b); diâmetro dos túbulos do SSR (c) e altura do epitélio do SSR (d). Machos da Região A

Legenda: Linhas horizontais no interior das caixas representam valores médios, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os valores mínimos e máximos observados.

Fonte: Fernanda Magno Amaral (2015).

Figura 25 - Variação sazonal no diâmetro do túbulos seminíferos (a); altura do epitélio dos túbulos seminíferos (b); diâmetro dos túbulos do SSR (c) e altura dos epitélio do SSR (d). Machos da Região B

Legenda: Linhas horizontais no interior das caixas representam valores médios, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os valores mínimos e máximos observados.

Fonte: Fernanda Magno Amaral (2015).

O ciclo espermatogênico de *B. alternatus*, de ambas Regiões, é descontínuo cíclico a nível individual e sazonal sincrônico a nível populacional. Segundo análises histológicas, foi observada uma pequena diferença em relação ao ciclo dos machos da Região A e os machos da Região B.

O ciclo espermatogênico dos machos da Região A (Figura 26): recrudescência (estágio 2) ocorre no final da primavera e começo do verão; a espermiogênese se inicia no meio do verão, com o pico da produção de espermatozoides no outono e início do inverno (estágio 3 e 4) (Figura 27 A, B e C); a regressão começa no meio do inverno e continua ao longo da primavera (estágio 5, 6 e 1) (Figura 27 D). A hipertrofia do SSR ocorreu no outono e no inverno, período que coincide com a cópula (Figura 28). E a estocagem de espermatozoide nos ductos deferente ocorre ao longo de todo o ano (Figura 29).

Figura 26 - Síntese do ciclo reprodutivo de machos da Região A

Fonte: Fernanda Magno Amaral (2015).

Figura 27 - Histologia de corte longitudinal dos túbulos seminíferos dos machos da Região A

Legenda: Túbulo seminífero em estágio 3, verão (A); túbulo seminífero em estágio 3, outono (B); túbulo seminífero em estágio 4 –pico–, outono/inverno (C); túbulo seminífero em estágio 1, primavera (D).

Fotos: Fernanda Magno Amaral (2015).

Figura 28 - Histologia de corte longitudinal dos túbulos do segmento sexual renal dos machos da Região A

Legenda: Túbulos do SSR hipotrofiados, primavera e verão (A); túbulos do SSR hipertrofiado, outono e inverno (B).

Fotos: Fernanda Magno Amaral (2015).

Figura 29 - Histologia de corte longitudinal dos ductos deferentes dos machos da Região A

Legenda: Ductos deferentes com estocagem de espermatozoides, verão, outono, inverno e primavera.

Fotos: Fernanda Magno Amaral (2015).

O ciclo espermatogênico dos machos da Região B (Figura 30): recrudescência (estágio 2) ocorre na primavera; a espermiogênese se inicia no verão, com o pico da produção de espermatozoides no verão e outono (estágio 3 e 4); a regressão ocorre no inverno (estágio 5, 6 e 1) (Figura 31). A hipertrofia do SSR ocorreu no outono, no inverno e no início da primavera, período que coincide e procede a cópula (Figura 32). E a estocagem de espermatozoide nos ductos deferentes ocorre ao longo de todo o ano (Figura 33).

Figura 30 - Síntese do ciclo reprodutivo de machos da Região B

Fonte: Fernanda Magno Amaral (2015).

Figura 31 - Histologia de corte longitudinal dos túbulos seminíferos dos machos da Região B

Legenda: Túbulos seminíferos em estágio 4, verão (**A**); túbulos seminíferos em estágio 4, outono (**B**); túbulos seminíferos em estágio 5, inverno (**C**); túbulos seminíferos em estágio 1, início da primavera (**D**).

Fotos: Fernanda Magno Amaral (2015).

Figura 32: Histologia de corte longitudinal dos túbulos do segmento sexual renal dos machos da Região B

Legenda: Túbulos do SSR hipotrofiados, final da primavera e verão (**A**); túbulos do SSR hipertrofiado, outono, inverno e início de primavera (**B**).

Fotos: Fernanda Magno Amaral (2015).

Figura 33 - Histologia de corte longitudinal dos ductos deferentes dos machos da Região B

Legenda: Ductos deferentes com estocagem de espermatozoides, verão, outono, inverno e primavera.

Fotos: Fernanda Magno Amaral (2015).

2.3.4 Síntese do ciclo de fêmeas e machos

O ciclo vitelogênico para as fêmeas da região A tem início no verão e continua ao longo do outono e inverno. Quando os folículos já estão maduros, no final do inverno e primavera, ocorre a ovulação e posterior fertilização. A gestação tem duração em média de 4 meses e os nascimentos ocorrem ao longo do verão e outono. O período de cópula pode-se dizer que é outonal se estendendo para o inverno e foi encontrado UMT com espermatozoides no início do outono. Nos machos o ciclo testicular tem início no final da primavera com a espermiogênese ocorrendo no verão, outono e início de inverno. Os espermatozoides são estocados ao longo do ano nos ductos deferentes e a hipertrofia do SSR tem uma relação mais direta com essa estocagem e com a cópula do que com a espermiogênese, uma vez que a hipertrofia do SSR ocorre ao longo do outono e do inverno.

Já para a região B, o ciclo vitelogênico nas fêmeas é mais estendido, ocorrendo desde o verão até a primavera. A ovulação, por sua vez ocorre na primavera e assim a fertilização. A gestação tem duração em torno de 4 meses e as parturições ocorrem no verão e outono. O período de cópula ocorre no outono e no inverno, espermatozoides no UMT são encontrados no outono e estocagem no infundíbulo, no inverno. Nos machos a recrudescência tem início no final da

primavera e a espermiogênese ocorre ao longo do verão e outono. A estocagem dos espermatozoides nos ductos deferentes ocorre em todas as estações do ano e a hipertrofia do SSR ocorre no outono, inverno e início da primavera. O que também indica uma relação maior com o período de acasalamento e de estocagem de espermatozoides nos ductos deferentes, do que com a espermiogênese (Figura 34).

Figura 34 - Síntese do ciclo das fêmeas e machos de *Bothrops alternatus* das regiões A e B

Legenda: Região A (**A**); região B (**B**). espermatozoide (**sptz**); infundíbulo (**inf.**).

Fonte: Fernanda Magno Amaral, 2015.

2.4 DISCUSSÃO

O conhecimento e a comparação dos ciclos reprodutivos entre diferentes populações de uma espécie é interessante, sob o ponto de vista evolutivo, porque permite medir a plasticidade do modelo reprodutivo empregado por serpentes que habitam regiões temperadas e de serpentes que habitam regiões tropicais. Desta forma, pode-se também avaliar em relação ao padrão reprodutivo filogenético conservado, se o ciclo é semelhante entre diferentes espécies de uma população de viperídeos.

Os ciclos reprodutivos estão sujeitos à influência de variáveis ambientais, como clima, relevo, altitude, pluviosidade e disponibilidade de alimento, com isso os ciclos reprodutivos podem se diferenciar entre serpentes que possuem uma ampla distribuição geográfica (BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; FITCH, 1982). Por esse motivo, alguns autores sugeriram que os ciclos reprodutivos de serpentes da região tropical deveriam ser contínuos em função das condições climáticas (altas temperaturas) e grande disponibilidade de presas nos ecossistemas tropicais (FITCH, 1982; VITT, 1983; SEIGEL; FORD, 1987). Porém, alguns estudos sobre a biologia reprodutiva de serpentes e de alguns lagartos da região tropical revelaram que muitas espécies apresentam ciclos sazonais (JAMES; SHINE, 1985; VITT, 1992; MARQUES, 1996; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; BROWN; SHINE, 2006; PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS; MARQUES, 2007). Uma possível explicação para a existência de ciclos reprodutivos sazonais nos trópicos é que esta seja uma característica conservada em algumas linhagens filogenéticas de serpentes (JAMES; SHINE, 1985; VITT, 1992; MARQUES, 1996).

Segundo a classificação de ciclos de Mathies (2011), os ciclos reprodutivos de fêmeas e machos de *Bothrops alternatus* de ambas populações podem ser caracterizados como descontínuo sazonal, pois em ambos os sexos são observados período de inatividade reprodutiva.

A reprodução de fêmeas de *B. alternatus* pode ser considerada sazonal semi-sincronica (MATHIES, 2011) pelo fato de haver algumas variações no tempo de alguns eventos reprodutivos como o desenvolvimento folicular e a ovulação, mas o tempo de gestação e parturição não variam. Com isso a inércia filogenética parece

ser um fator que exerce um papel preponderantemente no ciclo de *Bothrops alternatus*.

Segundo Aldridge (1979) há diferenças nos padrões temporais da vitelogênese, desta forma ele sugeriu dois tipos básicos: Tipo I - crescimento na primavera e Tipo II - crescimento no verão, outono e primavera, sendo interrompido no inverno, quando as serpentes entram em hibernação. O Tipo II, é observado principalmente em serpentes da região temperada, porém, há muitos trabalhos descrevendo esse tipo de vitelogênese em muitos viperídeos da região tropical (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; HARTMANN et al., 2004; KASPEROVICZUS, 2009; NUNES et al., 2010; BARROS, 2011; BARROS et al., 2012; HOYOS-ARGÁEZ, 2012), mas sem a interrupção do crescimento folicular.

O processo vitelogênico em fêmeas de urutu cruzeiro da região A se inicia em meados do verão se estendendo até o inverno e provavelmente até a primavera. Não obtivemos dados de serpentes vitelogênicas nesta época do ano (primavera), mas podemos inferir que a vitelogênese se estenda até a primavera e que a ovulação ocorre nesta estação pois embriões sendo gestados (estágio inicial de desenvolvimento – 2) foram observados no final do inverno e ao longo da primavera. Além disso ovos atrésicos, sendo reabsorvidos pelo oviduto foram encontrados em uma das fêmeas no verão. Nas fêmeas da Região B o processo de deposição de vitelo nos folículos ocorre da mesma forma, se inicia no verão e se estende até a primavera onde ocorre a ovulação. Portanto, segundo a classificação de Aldridge (1979) os ciclos vitelogênicos de *B. alternatus* de ambas as regiões são do Tipo II.

Há uma grande diferença na proporcionalidade de fêmeas reprodutivas encontradas na Região A e Região B. Foi encontrado uma quantidade muito maior de fêmeas vitelogênicas na Região B do que na Região A. Apesar da região B ser de clima temperado o regime de chuvas é constante, o que não ocorre na Região A que possui períodos de chuvas marcadas. Isso pode influenciar na disponibilidade de presas, partindo do pressuposto que a reprodução requer uma alta demanda de energia, influenciada pela quantidade de reservas lipídicas dos corpos das fêmeas (SHINE, 1986; NAULLEAU; BONNET, 1996; NUNES et al., 2010). Deste modo a

freqüência reprodutiva é dependente do “status” nutricional das fêmeas (STEARNS, 1992) como é observado em *Vipera aspis* (BONNET et al., 1994) e em algumas cascavéis da região temperada (MACARTNEY; GREGORY, 1988).

A cópula foi registrada para as duas populações, para Região A no final do outono e início do inverno e para a Região B, no início do inverno. Contudo, baseado na histologia do trato reprodutor das fêmeas, pode-se observar estocagem de espermatozoide no útero aglandular, região do UMT (*uterine muscular twisting*) nos períodos de final do verão e ao longo do outono, o que pode-se evidenciar que o período de cópula em *B. alternatus* também ocorra no final de verão e ao longo do outono.

Dessa forma, podemos afirmar que o período marcado de cópula de *B. alternatus* de ambas regiões é outonal, podendo se estender para o inverno. A cópula no outono/inverno é observada em diversos viperídeos neotropicais (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; NOGUEIRA et al., 2003; ALMEIDA-SANTOS, 2005; KASPEROVICZUS, 2009; NUNES et al., 2010; BARROS, 2011; BARROS et al., 2012). Apesar de regiões temperadas, consequentemente, mais frias e com o período do verão mais curto (SAINT-GIRONS, 1982), as serpentes que habitam a Região B apresentam atividade reprodutiva, tais como cópula e vitelogênese, no período do inverno. Neste estudo pudemos observar que tanto serpentes que habitam regiões temperadas como as que habitam regiões tropicais apresentam uma marcada sazonalidade no processo de acasalamento. Essas observações diferem dos estudos de Aldridge e Durvall (2002) em que eles defendem a idéia de que a sazonalidade do período das cópulas em serpentes que habitam regiões tropicais, onde os invernos são mais amenos, tende a desaparecer. Fatores filogenéticos também parecem influenciar fortemente a época de acasalamento não só em *B. alternatus* como em todos os viperídeos neotropicais (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002).

O período de cópula em *B. alternatus* das duas regiões estudadas é dissociado da época de fertilização dos folículos (primavera). Essas observações também se ajustam ao padrão geral observado em outras espécies do gênero *Bothrops* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002).

Uma vez que a ovulação/fertilização ocorrem na primavera, e as cópulas ocorrem anteriormente a esse período há uma assincronia entre esses eventos. Segundo estudos feitos em *Crotalus durissus* por Almeida-Santos e Salomão (2002), as fêmeas necessitam armazenar o esperma por um período de aproximadamente cinco meses entre a cópula e a fertilização. Isso ocorre porque a fertilização provavelmente se dê no período mais quente em função do desenvolvimento embrionário, que ocorre na primavera e verão, no caso de *B. alternatus*. Desta forma, a estocagem de espermatozoides no trato reprodutivo das fêmeas, por um certo período, se torna indispensável (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; SCHUETT et al., 2002; GIRLING, 2002; SIEGEL et al., 2009).

O tempo de retenção dos espermatozoides nos ovidutos é muito variável, podendo ser de dias até mais de um ano (Rahn, 1940; Fox, 1956). Dentre os Viperídeos, são conhecidas duas regiões no oviduto que alojam os espermatozoides: o infundíbulo posterior, que apresenta túbulos de estocagem de espermatozoides especializados (SIEGEL et al., 2011) e o útero aglandular (FOX, 1956; HOFFMAN; WIMSATT, 1972; HALPERT; GARSTKA; CREWS, 1982; ALDRIDGE, 1992; PERKINS; PALMER, 1996; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; SEVER; RYAN, 1999; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; SIEGEL; SEVER, 2006; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a). Nesta última região a estocagem ocorre em sulcos profundos ou por meio de uma contração uterina, denominada como *uterine muscular twisting* (UMT) (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; 2002). Os espermatozoides limitados neste espaço permanecem estocados nas dobras do útero e viáveis por todo o inverno ascendendo provavelmente para a região infundibular no final da primavera (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002) quando há um relaxamento da musculatura uterina (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997) e assim ocorrendo a fertilização (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002).

Neste estudo com *B. alternatus* encontramos os dois tipos de estocagem de espermatozoides. O primeiro tipo, o UMT, o qual ocorre modificações fisiológica e atua sobre influência hormonal (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004), foi encontrado ao longo do ano nas fêmeas das duas regiões. Mas as análises histológicas dessa área nos revelou que nem todos os UMT's continham espermatozoides em seus sulcos. Somente nos períodos de

outono, inverno e somente um caso na primavera foram encontrados UMT com a presença de espermatozoides. Esse período coincide ou sucede a época de cópula dessa espécie.

Siegel e Sever (2006) questionaram a estocagem de espermatozoides no útero aglandular, se é um local realmente válido para estocagem ou trata-se apenas de um local de agregação de espermatozoides, uma vez que as causas e funções dessas agregações não são muito conhecidas. Acreditamos que possa ser um lugar onde os espermatozoides são selecionados, onde possa haver uma competição entre os espermatozoides, sendo, portanto, uma região de estocagem temporária. Sabe-se, no entanto, que a formação do UMT está relacionada com hormônios sexuais, principalmente com o estradiol e com a arginina vasotocina na manutenção e estabilidade da contração (YAMANOUYE et al., 2004). Desta forma, variações nesses hormônios podem refletir na formação do UMT, sem mesmo ter ocorrido a cópula e assim, não havendo a estocagem de esperma, como ocorreu em várias fêmeas de ambas regiões.

Segundo Fox (1956), esses espermatozoides estocados na região do UMT são oriundos de um possível acasalamento recente e em um curto período seriam atraídos para o infundíbulo posterior, onde seriam maiores as chances de fertilização. As glândulas tubulosas presentes no infundíbulo são formadas após a cópula por invaginações do próprio epitélio infundibular e são compostas por células ciliadas e células secretoras não ciliadas, sendo conhecida para várias espécies de viperídeos (*Cerastes cerastes*, SAINT-GIRONS, 1962b; *Crotalus viridis*, LUDWIG; RAHN, 1943; *Vipera aspis*, SAINT-GIRONS, 1957; *Bothrops erythromelas*, BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014b).

Para a urutu cruzeiro sugerimos que a região do útero aglandular seja uma região de estocagem após a cópula, onde ocorreria a seleção dos espermatozoides, ou apenas como um plug copulatório para assegurar que os espermatozoides fiquem na região uterina. Entretanto, não seria uma estocagem rápida com descrito por Fox (1956), por exemplo. Acreditamos que os espermatozoides fiquem na região do UMT até o final da vitelogênese, onde há uma liberação de hormônios e os espermatozoides ascenderiam até o infundíbulo, onde ficariam por um curto período até o momento da ovulação (ALMEIDA-SANTOS,

1997). Essa hipótese é corroborada pelo fato de haver observações de espermatozoides estocados no infundíbulo somente no inverno e primavera, época de pico da vitelogênese seguida da ovulação.

O período de gestação para *B. alternatus* é controverso na literatura, quatro a cinco meses (AMARAL, 1918-1924) cinco a seis meses (PEZZANO, 1986) e nove meses (LEITÃO-DE-ARAÚJO; PERAZZOLO, 1974). Nunes et al. (2010) descreveu uma gestação de sete meses para as serpentes do sul do Brasil. Porém, todos esses dados são de cativeiro o que pode superestimar o período de gestação por causa da estocagem de esperma nas fêmeas. Portanto, neste estudo, concluiu-se que o tempo de gestação da urutu dura em torno de quatro a cinco meses, desde a ovulação (primavera) até os nascimentos dos filhotes (verão), assim como acontece em *B. jararaca* (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002).

Segundo Vinegar (1974), a época de gestação ser no período mais quente do ano pode ser explicada pelo fato de que altas temperaturas aumentam a taxa de desenvolvimento embrionário e pode reduzir a incidência de anomalias. Aparentemente o recrutamento de filhotes em períodos quentes do ano é uma característica comum para espécies do gênero *Bothrops* (SAZIMA, 1992; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002).

A fecundidade é um fator importante a ser estudado em virtude de se poder calcular o investimento reprodutivo da espécie (ALMEIDA-SANTOS, 2005). Os poucos dados existentes sobre a fecundidade de *B. alternatus* indicam que esta espécie pode parir entre 12 e 13 filhotes por ninhada (LEITÃO DE ARAÚJO; PERAZZOLO, 1974; NUNES et al., 2010). No presente estudo registra-se ninhadas de até 21 filhotes, o que indica que esta espécie pode ter mais filhotes por ninhada, em média 11 filhotes por ninhada.

Em fêmeas de serpentes a fecundidade está relacionada ao tamanho da mãe (SHINE, 1980; SEIGEL; FORD, 1987). Nas fêmeas de ambas regiões foram encontradas uma correlação positiva entre o número de filhotes e o comprimento da mãe, assim como o número de folículos em V1 e o CRC materno.

A reprodução envolve um custo energético muito grande aos indivíduos, principalmente para as fêmeas. Esse gasto energético envolve a energia para

alocação da ninhada em seu corpo e a termorregulação durante a prenhez. Estes custos impõe uma forte seleção de ajustes nas táticas reprodutivas para condições locais, tais como a disponibilidade de presas, gerando, assim, divergências interespecíficas nessas táticas reprodutivas (SHINE, 2003)

Foi observado que fêmeas de *B. alternatus* das Regiões A e B apresentam um ciclo reprodutivo sazonal onde os eventos reprodutivos (cópula, vitelogênese, fecundação, gestação, e nascimento dos filhotes) acontecem nas mesmas épocas do ano. Com isso, podemos afirmar que o ciclo reprodutivo de fêmeas desta espécie apresenta um grau de conservatismo. Portanto, de forma geral, o ciclo reprodutivo de fêmeas de *B. alternatus* é similar ao encontrado em outras espécies do gênero *Bothrops* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; VALDUJO et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2003; HARTMANN et al., 2004; BARROS, 2011; KASPEROVICZUS, 2013), corroborando o conservatismo reprodutivo do gênero *Bothrops* sugerido por Almeida-Santos e Salomão (2002). No entanto, alguns eventos como a vitelogênese tende a ser mais estendido em *B. alternatus*, principalmente no sul, Região B.

Em relação ao ciclo dos machos, segundo Saint-Girons (1982), todos os Colubrídeos do Novo Mundo e Crotalídeos que habitam regiões temperadas apresentam espermatogênese no verão. Nessas espécies a espermatogênese começa na primavera ou verão, com pico na metade do verão e declínio no outono, assim os espermatozóides são estocados nos ductos deferentes até o acasalamento (ALDRIDGE; DUVALL, 2002). Esse tipo de ciclo espermatogênico é conhecido como “dissociado” e já foi observado também em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca*, com o acasalamento ocorrendo na época em que os testículos estão inativos (ALMEIDA-SANTOS, 2005). Já o ciclo de *B. alternatus* de ambas regiões se classificaria como “associado” (segundo classificação de SAINT GIRONS, 1982; SCHUETT, 1992), pelo fato da espermatogênese coincidir ou preceder a época de acasalamento. E conforme a classificação de Mathies (2011) o ciclo dos machos a nível individual é descontínuo cíclico, pois há um período de regressão total dos testículos e a nível populacional pode ser classificado como sazonal sincrônico, pois há uma sincronia entre os indivíduos nos eventos de recrudescência, espermiogênese e regressão dos testículos.

Apesar da produção de gametas coincidir com a época de cópula, os machos dessa espécie estocam espermatozoides ao longo do ano. Medidas macroscópicas do ducto deferente associadas a análises histológicas dessa estrutura, mostraram a presença contínua de espermatozoides nesse local. O ducto deferente é o principal órgão de estocagem de esperma e esta estocagem tem sido descrita em vários gêneros de serpentes colubrídeas tais como, *Natrix*, *Masticophis*, *Pituophis*, *Seminatrix*, em elapídeos, como *Micrurus* (ALMEIDA-SANTOS et al., 2000), bem como em Viperídeos como: *Trimeresurus*, *Crotalus* e *Bothrops* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; BAUMAN; METTER, 1977; GOLDBERG; JANEIRO-CINQUINI et al., 1993b).

Em estudos com viperídeos de regiões temperadas, Aldridge e Duvall (2002), determinaram que o acasalamento é independente da espermatogênese e que os machos na verdade se adaptariam ao ciclo das fêmeas. Assim, indicando um potencial para a ocorrência de cópula em qualquer época do ano, fato já observado em outros estudos (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004).

Na Região A as medidas macroscópicas do volume do testículo, apesar de não ter tido significância estatística, possui uma tendência a aumentar no verão e outono, o que coincide com as medidas microscópicas, o aumento do diâmetro e da altura do epitélio dos túbulos seminíferos, caracterizando o processo de espermatogênese nessas estações. Além disso, os cortes histológicos mostraram que a espermiogênese, na qual se observa uma densidade maior de espermátides e espermatozóides maduros, acontece durante o verão, outono e início do inverno e a regressão a partir do inverno a té a primavera.

Já as análises das medidas macroscópicas do SSR não apresentaram significância estatística nos tamanhos, tanto no comprimento quanto na largura do rim. Este fato é comum em serpentes, pois o rim geralmente não varia muito em comprimento e largura entre a fase ativa (acasalamento) e a fase de repouso (FOX, 1977; SEVER et al., 2007). Portanto, medidas microscópicas revelaram que tanto o diâmetro quanto a altura do epitélio dos túbulos do SSR sofreram hipertrofia no outono e no inverno, estações as quais ocorrem a cópula nesta espécie, assim

como análises histológicas desse órgão também demonstram essa hipertrofia nessas estações.

Para os machos da Região B análises macroscópicas dos testículos nos mostrou que, apesar de não haver significancia estatística, houve uma tendência de aumento no volume dos testículos no outono, fato que também coincide com os dados microscópicos de diâmetro e altura do epitélio dos túbulos seminíferos. Além disso as análises histológicas demonstraram que a espermiogênese tem início no verão se estendendo ao longo do outono e portanto há uma regressão no inverno até a primavera.

Nas análises dos dados macroscópicos do rim não houve diferença significativa no comprimento deste órgão, portanto a largura teve um aumento significativo no outono. Este dado coincide com as medidas microscópicas tanto do diâmetro quanto da altura do epitélio dos túbulos do SSR, que tem hipertrofia no outono. O SSR, nas análises histológicas, apresentaram-se hipertrofiados nesta mesma estação dos dados mensurados, além do inverno, as quais são épocas de cópula.

As células do SSR são andrógeno-dependentes e com o aumento dos níveis de testosterona no sangue há uma hipertrofia nessa região tubular (FOX, 1977; SEVER; HOPKINS, 2005; ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2013). Por isso, a época de hipertrofia do SSR coincide com a época de cópula, onde o hormônio testosterona está em altos níveis (SEIGEL; SEVER, 2011)

Apesar das avaliações morfológicas, principalmente dos testículos, não se mostrarem muito eficientes para descrição do ciclo reprodutivo de machos (MATHIES, 2011), neste estudo, as medidas macroscópicas coincidiram com as demais análises, mensurações microscópicas e análises histológicas. Contudo, o uso apenas de mensurações macroscópicas, podem induzir a uma interpretação equivocada do ciclo da espécie em estudo (MATHIES, 2011). Dessa forma, para se ter uma análise e um resultado efetivo do ciclo, a histologia se torna indispensável, pois reflete as variações sazonais ocorridas nos testículos, ductos e rins.

Saint-Girons (1982) sugere que o único fator ambiental determinante para o ciclo reprodutivo dos machos é a temperatura. Contudo, nos machos da Região A a

espermiogênese se estende até o início do inverno. Esse fato pode ser explicado pelas temperaturas relativamente altas no inverno (média de 23° a 24° C) em climas tropicais, como no caso da Região A. No entanto, como observado no ciclo reprodutivo dos machos num todo, em ambas regiões, os padrões parecem ter um viés filogenético, ou seja, é um ciclo sazonal conservado. Por isso o ciclo espermatogênico dos machos da Região A, não é contínuo.

De modo geral o pico da espermiogênese para ambas regiões é no verão/outono. As cópulas foram observadas predominantemente no outono e inverno, contudo elas poderiam ocorrer em qualquer época do ano, uma vez que os espermatozoides estão estocados nos ductos deferentes em todas as estações. Porém, os ciclos espermatogênicos são influenciados pelos hormônios sexuais masculinos (SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2002; SCHUETT et al., 2002), que por sua vez determinam a época da procura pelas fêmeas. As fêmeas, por sua vez, estão atrativas quando produzem níveis altos de estradiol relacionados à vitelogênese (ALDRIDGE; DUVALL, 2002). Desta forma, as fêmeas de *B. alternatus* determinam a época do acasalamento, como já fora enfatizado por Sever e Ryan (1999) e Aldridge e Duvall (2002) para outras espécies.

Após a cópula, as fêmeas, das duas regiões em estudo, estocam esperma no útero aglandular e no infundíbulo durante o outono e inverno. Assim sendo, os ciclos reprodutivos de fêmeas e machos se harmonizam, por meio da estocagem de esperma, tanto dos machos nos ductos deferentes quanto das fêmeas no útero e infundíbulo, após a cópula, onde permanecem até ocorrer a fertilização na primavera.

Entretanto, os ciclos reprodutivos de fêmeas e machos das Regiões A e B se apresentam com pequenas diferenças no tempo dos eventos reprodutivos. Foi observado que há uma proporção maior de fêmeas reprodutivas (V2) na região B do que na região A. Esse fato também foi observado por Nunes et al. (2010), o que corrobora com estes dados. Assim como maior número de nascimentos de filhotes, prenhez e estocagem de esperma. Isso reflete uma maior adaptação desta espécie em regiões com climas mais frios. O que corroboraria com a hipótese de que o ancestral comum das espécies do grupo *alternatus* tenha tido uma dispersão a

partir do Chaco-Pampa e Araucária, ou seja, regiões de clima mais frios (ARAÚJO, 2015).

2.5 CONCLUSÕES

- Ciclos reprodutivos de fêmeas e machos das duas regiões (A = sudeste e centro-oeste e B = sul) são sazonais. Os principais eventos dos ciclos reprodutivos, como época de cópula, estocagem contínua de espermatozoides nos ductos deferentes dos machos, estocagem de esperma nas fêmeas durante outono e inverno e nascimento dos filhotes no verão, são semelhantes.
- A vitelogênese, de ambas regiões, é sazonal semi-sincrônica, tendo início no verão e os folículos atingindo maiores tamanhos no inverno.
- O útero aglandular apresentando-se em contorção (*uterine muscular twisting*) foi encontrado ao longo do ano nas fêmeas das duas regiões. Mas, por meio de análises histológicas dessa estrutura, pode-se observar que somente no outono e inverno foram encontrados espermatozoides nos sulcos do UMT. E no infundíbulo houve estocagem de espermatozoides no túbulos de estocagem durante todo o inverno, período que coincide ou sucede a época de cópula dessa espécie.
- Nos machos foram observados a estocagem de esperma nos ductos deferentes em todas as estações do ano, nas duas populações.
- Mudanças sazonais na hipertrofia do SSR de *B. alternatus* estão associadas com época de cópula, logo com os altos níveis de testosterona no organismo dos machos. Assim, a hipertrofia do SSR coincide com a estocagem de espermatozoides nos ductos deferentes.
- O ciclo dos machos foi classificado como “associado”, pois a espermiogênese coincide ou precede a época de cópula. Assim, a nível individual o ciclo pode ser considerado descontínuo cíclico, pois há um

período de regressão total dos testículos; e a nível populacional pode ser classificado como sazonal sincrônico, pois há uma sincronia entre os indivíduos nos eventos de recrudescência, espermiogênese e regressão dos testículos.

- Há uma sincronia de alguns eventos reprodutivos nos mesmos períodos do ano, em ambas as regiões (eg.: época de nascimentos, época de gestação e época de acasalamentos). Portanto pode-se dizer que os ciclos reprodutivos de fêmeas e machos de *Bothrops alternatus* são conservados.
- Também há diferenças em outros eventos reprodutivos, tais como a vitelogênese, mais estendida e maior proporção de fêmeas reprodutivas no sul do Brasil (região B) e espermiogênese que na região sudeste e centro-oeste (região A) se estende até meados do inverno. Esses fatos evidenciam que a reprodução sofre influência dos fatores ambientais (temperatura e pluviosidade).

REFERÊNCIAS

- ALDRIDGE, R. D. Female Reproductive Cycles of the Snakes *Arizona elegans* and *Crotalus viridis*. **Herpetologica**, v. 35, n. 3, p. 256-261, 1979.
- ALDRIDGE, R. D. Oviductal anatomy and seasonal sperm storage in the south eastern crowned snake (*Tantilla coronata*). **Copeia**, p. 1103-1106, 1992.
- ALDRIDGE, R. D.; DUVALL, D. Evolution of the mating season in the pitvipers of North America. **Herpetological Monographs**, v.16, p. 1-25, 2002.
- ALDRIDGE, R. D.; JELLEN, B. C.; SIEGEL, D. S.; WISNIEWSKI, S. S. The sexual segment of the kidney. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Florida: CRC Press, Boca Raton, 2011. v. 9, p. 477-509.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. 2005. 204f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; FERREIRA, I. L.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C. Sperm storage in males of the snake *Crotalus durissus terrificus* (Crotalinae: Viperidae) in southeastern Brazil. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 139, p. 169-74, 2004.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ORSI, A. M. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, viperidae): morfologia e função do oviduto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 2, p. 109-112, 2002.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; PRADO, L.; MARQUES, O. A. V. Eventos sincrônicos na reprodução da “cobra coral” *Micrurus corallinus* (Elapidae) do Sudeste do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 23., 2000, Mato Grosso. **Anais...**, Mato Grosso: CBZ, 2000. p. 245.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Long-term sperm storage in the female neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (viperidae: Crotalinae). **Japanese Journal of Herpetology**, v. 17, n. 2, p. 46-52, 1997.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: Schuett, G. W.; Hoggren, M.; Douglas, M. E.; Greene, H. W. (eds.). **Biology of the Vipers**. Utah, Eagle Mountain Publishing; 2002. p. 445-462.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; BRAZ, H. B.; SANTOS, L. C.; SUEIRO, L. R.; BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; KASPEROVICZUS, K. N. Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados. **Herpetologia Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 14-24, 2014.

AMARAL, A. Contribuição à biologia dos Ophideos brasileiros (reprodução). **Colinea Trab. Inst. Butantan**, v. 2, p. 167-181, 1918-1924.

ARAÚJO, D. P. **Biogeografia histórica das jararacas do grupo *Bothrops alternatus* (Serpentes, Viperidae)**. 2015, 54 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, 2015.

BARROS, V. A. **Biologia reprodutiva de três espécies de serpentes da Família Viperidae da região neotropical**. 2011. 97 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, 2011.

BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Is rainfall seasonality important for reproductive strategies in viviparous Neotropical pit vipers? A case study with *Bothrops leucurus* from the Brazilian Atlantic Forest. **Herpetological Journal**, v. 24, p. 69-77, 2014a.

BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. **Advances in Zoology**, v. 2014, p. 01-11, 2014b.

BARROS, V. A.; SUEIRO, L. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of

phylogenetic conservatism of reproductive patterns. **Herpetological Journal**, v. 22, p. 97-104, 2012.

BAUMAN, M. A.; METTER, D. E. Reproductive cycle of the Northern Watersnake, *Natrix s. sipedon* (Reptilia, Serpentes, Colubridae). **Journal of Herpetology**, v. 11, p. 51-59, 1977.

BONNET, X.; NAULLEAU, G.; MAUGET, R. The influence of body condition on 17 β estradiol levels in relation to vitellogenesis in female *Vipera aspis* (Reptilia, Viperidae). **General Comparative Endocrinology**, v. 93, p. 424-437, 1994.

BROWN, G. P.; SHINE, R. Reproductive ecology of a tropical natricine snake, *Tropidonophis mairii* (Colubridae). **Journal of Zoology London**, v. 258, p. 63-72, 2002.

CALLARD, I. P.; CALLARD, G. V.; LANCE, V.; BOLAFFI, J. L.; ROSSET, J. S. Testicular Regulation in Nonmammalian Vertebrates. **Biology of Reproduction**, v.18, p. 16-43, 1978.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. Ithaca: Cornell University Press, 2004. p. 870.

CLESSON, D.; BAUTISTA, A.; BALECKAITIS, D. D.; KROMER, R. W. Reproductive Biology of Male Eastern Garter Snakes (*Thamnophis sirtalis sirtalis*) from a Denning Populations in Central Wisconsin. **The American Midland Naturalist Journal**, v. 147, p. 376-86, 2002.

ECKSTUT, M. E.; SEVER, D. M.; WHITE, M. E.; CROTHER, B. I. Phylogenetic analysis of sperm storage in female squamates. In: Lucas T. Dahnof (ed.). **Animal Reproduction: New Research Developments**. Nova York: Nova Science Publishers, Inc; 2009. p.185-218.

FITCH, H. S. Reproductive cycles in tropical reptiles. **Occasional Papers of the Museum of Natural History University of Kansas**, v. 96, p. 1-53, 1982.

FOWLER, I. R.; SALOMÃO, M. G.; JORDÃO, R. S. A description of the female reproductive cycle in four species from the neotropical colubrid snake *Philodryas* (Xenodontinae). **Snake**, v. 28, p. 71-8, 1998.

FOX, H. The urogenital system of reptiles. In: GANS, C.; PARSONS, T. S. **Biology of the reptilia**. Academy press, New York, 1977. v. 6, p. 1-157.

FOX, W. Seasonal variation in the male reproductive system of Pacific coast garter snakes. **Journal Morphology**, v. 90, p. 481-553, 1952.

FOX, W. Seminal receptacles of snakes. **Anatomic Record**, v. 124, p. 519-539, 1956.

GIRLING, J. E. The Reptilian Oviduct: A Review of Structure and Function and Directions for Future Research. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, p. 141-170, 2002.

GOLDBERG, S.R.; PARKER, W.S.. Seasonal testicular histology of the colubrid snakes, *Masticophis taeniatus* and *Pituophis melanoleucus*. **Herpetologica**, v. 31, p. 317-322, 1975.

GRAHAM, S. **An integrative analysis of reproduction and stress in free-living male cottonmouths, *Agkistrodon piscivorus***. 2006. 85 p. Dissertation (Master of science) - Faculdade "College of Arts and Sciences", Georgia State University. U.S.A, 2006.

HALPERT, A. P.; GARSTKA, W. R.; CREWS, D. Sperm transport and storage and its relation to the annual sexual cycle of the female red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*. **Journal of Morphology**, v. 174, p. 149-159, 1982.

HARTMANN, M. T.; MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of the southern Brazilian pitviper *Bothrops neuwiedi pubescens* (Serpentes, Viperidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 25, p. 77-85, 2004.

HOFFMAN, L. H.; WIMSATT, W. A. Histochemical and electron microscopic observations on the sperm receptacles in the garter snake oviduct. **American Journal. Anatomy**, v.134, p. 71-96, 1972.

HOYOS ARGÁEZ, M. A. **A cascavel neotropical *Crotalus durissus*: uma abordagem morfológica e da história natural em populações do Brasil**. 2012. 130p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

JAMES, C.; SHINE, R. The seasonal timing of reproduction: A tropical-temperate comparison in Australian lizards. **Oecologia**, v. 67, p. 464-474, 1985.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F.; LEINZ, F. F.; FARIAS, E. C. Seasonal variation in weight and length of the testicles and the quantity of abdominal fat of the snake *Bothrops jararaca*. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 55, p. 15-9, 1993.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem Journal**., v. 11, p. 447-455, 1979.

KASPEROVICZUS, K. N. **Biologia reprodutiva da jararaca Ilhoa, *Bothrops insularis*, (Serpentes: Viperidae) da Ilha da Queimada Grande, São Paulo**. 2009. 126 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

KASPEROVICZUS, K. N. **Evolução das estratégias reprodutivas de *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. 2013. 135 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

KROMER, R.W.; MARTINEZ, D.; MASON, R.T. Development of the renal sexual segment in immature snakes: effect of sex steroid hormones. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 139, p. 55-64, 2004.

LEITÃO-DE-ARAÚJO, M.; PERAZZOLO, M. Nota prévia sobre a biologia de tanatofídeos em cativeiro. (Ophidia, Elapidae e Viperidae). **Iheringia**, v. 45, p. 55-66, 1974.

LUDWIG, M.; RAHN, H. Sperm storage and copulatory adjustment in the prairie rattlesnake. **Copeia**, n. 1, p. 15-18, 1943.

LUTTERSCHMIDT, D. I.; MASON, R. T. Endocrine mechanisms mediating temperature-induced reproductive behavior in red-sided garter snakes (*Thamnophis sirtalis parietalis*). **Journal of Experimental Biology**, v. 212, p. 3108-3118, 2009.

MACARTNEY, J. M.; GREGORY, P. T. Reproductive biology of female rattlesnakes (*Crotalus viridis*) in British Columbia. **Copeia**, p. 47-57, 1988.

MARQUES, O. A. V. Biologia reprodutiva da cobra-coral *Erythrolamprus aesculapii* (Colubridae), no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.13, n. 3, p. 747-753, 1996.

MARQUES, O. A. V. Reproduction, seasonal activity and growth of the *Micrurus corallines* (Serpentes, *Elapidae*). **Amphibia-Reptilia**, v. 17, p. 277-85, 1996a.

MARQUES, O. A. V.; PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive strategies of new world coral snakes, genus *Micrurus*. **Herpetologica**, v. 69, n. 1, p. 58-66, 2013.

MARQUES, O. A. V.; SAWAYA, R. J.; STENDER-OLIVEIRA, F.; FRANÇA, F. G. R. Ecology of the colubrid snake *Pseudablabes agassizii* in south-eastern South America. **Herpetological Journal**, v. 16, p. 37-45, 2006.

MATHIES, T. Reproductive cycles of tropical snakes. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. (Ed.). **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. New Hampshire: Science Publishers, Enfield, 2011. v. 1, p. 511-550.

MCPHERSON, R. J.; MARION, K. R. Seasonal testicular cycle of the stinkpot turtle (*Sternotherus odoratus*) in Central Alabama. **Herpetologica**, v. 37, p. 33-40, 1981.

MUNIZ-DA-SILVA, D. F. **Ciclo reprodutivo da caninana, *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Colubridae)**. 2012. 137 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

NAULLEAU, G.; BONNET, X. Body condition threshold for breeding in a viviparous snake. **Oecologia**, v. 107, p. 301-306, 1996.

NOGUEIRA, C.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 37, p. 653–659, 2003.

NUNES, S. F. **Dieta e Biologia reprodutiva da Cruzeiro, Bothrops alternatus (serpentes-viperidae), na região sul do Brasil**. 2006. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2006.

NUNES, S. F.; KAEFER, I. L.; LEITE, P. T.; CECHIN, S. Z. Reproductive and feeding biology of the pitviper *Rhinocerophis alternatus* from subtropical Brazil. **Herpetological Journal**, v. 20, p. 31-39, 2010.

OROFINO, R. P.; PIZZATTO, L.; MARQUES, O. A. V. Reproductive biology and food habits of *Pseudoboa nigra* (Serpentes: Dipsadidae) from the Brazilian cerrado. **Phyllomedusa**, v. 9, p. 53-61, 2010.

PEZZANO, V. Reproduction of *Bothrops alternatus* (Dumeril, Bibron & Dumeril, 1854) in captivity. **Litteratura Serpentina**, v. 6, p. 13-18, 1986.

PIZZATTO, L., ALMEIDA-SANTOS, S. M. & MARQUES, O. A. V. Biologia reprodutiva de serpentes brasileiras. In: Nascimento, L. B.; Oliveira, M. E. (Ed.). **Herpetologia no Brasil II**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia,. p.201-211, 2006.

PIZZATTO, L.; JORDÃO, R. S.; MARQUES, O. A. V. Overview of reproductive strategies in Xenodontini (Serpentes: Colubridae: Xenodontinae) with new data for *Xenodon neuwiedii* and *Waglerophis merremii*. **Journal of Herpetology**, v. 42, p. 153-62, 2008.

PIZZATTO, L.; MARQUES, O. A. V. Reproductive biology of the false coral snake *Oxyrhopus guibei* (Colubridae) from southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 23, p. 495-504, 2002.

PIZZATTO, L.; MARQUES, O. A. V. Reproductive ecology of *Boine* snakes with emphasis on Brazilian species and comparasion to phytons. **South American Journal of Herpetology**, v. 2, p. 107-122, 2007.

PLEGUEZUELOS, J. M.; FERICHE, M. Reproductive ecology of the horseshoe whip snake, *Coluber hippocrepis*, in the southeast of the Iberian Peninsula. **Journal of Herpetology**, v. 33, p. 202-7, 1999.

RAHN, H. Sperm viability in the uterus of the garter snakes, *Thamnophis*. **Copeia**, v. 1940, p. 107-115, 1940.

RASBAND, W. **ImageJ 1.46r**. National institute of health, USA, 2011. Disponível em: <<http://imagej.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 05 jan. 2015.

REGAURD, C.; POLICARD, A. Recherches sur la structure du rein de quelques ophidiens. **Arch Anat Microsc.**, v. 6, p. 191-282, 1903.

ROJAS, C. A. **Modulação fisiológica do ciclo reprodutivo, comportamento sexual e atividade sazonal em *Sibynomorphus mikanii* e *Sibynomorphus neuwiedii* (dormideira)**. 2009. 118p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ROJAS, C. A.; BARROS, V. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. The reproductive cycle of the male sleep snake *Sibynomorphus mikanii* (Schlegel 1837) from southeastern Brazil. **Journal of Morphology**, v. 274, n. 2, p. 215-228, 2013.

SAINT GIRONS, H. Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycles. **Herpetologica**, v. 38, p. 5-16, 1982.

SAINT-GIRONS, H. Le cycle reproducteur de la vipère à cornes, *Cerastes cerastes* (L.), dans la nature et en captivité. **Bulletin de la Société Zoologique de France** v. 87, p. 41-51, 1962.

SAINT-GIRONS, H. Le cycle sexuel chez *Vipera aspis* dans l'ouest de la France. **Bulletin Biologique de la France et de la Belgique**, v. 91, p. 284-350, 1957.

SAINT-GIRONS, H. Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycles. **Herpetologica**, v. 38, p. 5-16, 1982.

Salomão MG, Almeida-Santos SM. The reproductive cycle of male neotropical rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*). In: Schuett, G. W.; Hoggren, M.; Douglas,

M. E.; Greene, H. W. (eds.). **Biology of the Vipers**. Utah: Eagle Mountain Pub; 2002. p.507-514.

SASA, M.; WASKO, D. K.; LAMAR, W. W. Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. **Toxicon**, v. 54, p. 904-922, 2009.

SAZIMA, I. Natural history of the jararaca pitviper *Bothrops jararaca* in southeastern Brazil. In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE, JR., E. D. (Eds.). **Biology of the pitvipers**. Texas: Selva, 1992 p. 199-216.

SCHUETT, G. W. Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers? In: Campbell JA, Brodie Jr (eds). **Biology of pitvipers**. Texas: Selva; 1992. p. 199-216.

SCHUETT, G. W.; CARLISLE, S. L.; HOLYCROSS, A. T.; O'LEILE, J. K.; HARDY, D. L.; VAN KIRK, E. A.; MURDOCH, W.J. Mating system of male Mojave rattlesnakes (*Crotalus scutulatus*): seasonal timing of mating, agonistic behavior, spermatogenesis, sexual segment of the kidney, and plasma sex steroids. In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. (Ed.). **Biology of the vipers**. Carmel Indiana: Eagle Mountain, 2002. p. 515-532.

SEIGEL, D. S.; MIRALLES, A.; CHABARRIA, R. E.; ALDRIDGE, R. D. Female reproductive anatomy: cloaca, oviduct and sperm storage. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Enfield: CRC Press, 2011. p. 347-409.

SEIGEL, R. A.; FORD, N. B. Reproductive Ecology. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S. Snakes: **Ecology and Evolutionary Biology**. New York: MacGraw-Hill Publishing Company, 1987, p. 210-252.

SEVER D. M.; SIEGEL S. D.; BAGWILL A.; ECKSTUT E. M.; ALEXANDER L.; CAMUS A.; MORGAN C. Renal sexual segment of the cottonmouth snake *Agkistrodon piscivorous* (Reptilia, Squamata, Viperidae). **Journal of Morphology**, v. 1, p.1-14, 2007.

SEVER, D. M., RYAN, T. J. Ultrastructure of the reproductive cycle of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). Part I. Evidence for oviducal sperm storage. **Journal Morphology**, v. 238, p. 143-155, 1999.

SEVER, D. M.; HOPKINS, W. A. Renal Sexual Segment of the Ground Skink, *Scincella laterale* (Reptilia, Squamata, Scincidae). **Journal of Morphology**, v. 266, p. 46-59, 2005.

SEVER, D. M.; STEVENS, R. A.; RYAN, T.; HAMLETT, W. C. Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). III. Sexual segment of the male kidney. **Journal of Morphology**, v. 252, p. 238-54, 2002.

SHINE, R. "Costs" of reproduction in reptiles. **Oecologia**, v. 46, p. 92-100, 1980.

SHINE, R. Ecology of a low-energy specialist: food habits and reproductive biology of the Arafura Filesnake (Acrochordidae). **Copeia**, p. 424 – 437, 1986.

SHINE, R. Reproduction in australian elapid snakes I Testicular cycles and matting seasons. **Australian Journal of Zoology**, v. 25, p. 647-53, 1977.

SHINE, R. Reproductive strategies in snakes. **The royal society**, v.270, 995-1004, 2003.

SIEGEL, D. S.; SEVER, D. M. Sperm Aggregations in Female *Agkistrodon piscivorus* (Reptilia:Squamata): A Histological and Ultrastructural Investigation. **Journal of Morphology**, v. 269, p. 189-206, 2006.

SIEGEL, D. S.; SEVER, D. M.; RHEUBERT, J. L.; GRIBBINS, K. M. Reproductive Biology of *Agkistrodon piscivorus* Lacépède (Squamata, Serpentes, Viperidae, Crotalinae). **Herpetological Monographs**, v. 23, p. 74-107, 2009.

SIEGEL, R. A.; FORD, N. B. Reproductive ecology. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S. **Snakes: ecology and evolutionary biology**. New York: MacMillan Publ Co, p, 1987. 210-52.

STEARNS, S. C. **The evolution of life histories**. New York: Oxford Univesity Press, 1992. p. 248.

VALDUJO, P. H.; NOGUEIRA, C.; MARTINS, M. Ecology of *Bothrops Neuwiedi pauloensis* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 36, p.160-176, 2002.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, 1996. 196p.

VINEGAR, A. Evolutionary implications of temperature induced anomalies of development on snake embryos. **Herpetologica** 1974; 30: 72-74.

VITT, L. J. Strategies among Brazilian lizards and snakes: The significance of lineage and adaptation. In: HAMLETT, W. C, (ed.). **Reproductive biology of South American vertebrates**. New York: Springer-Verlag, New York, Inc, 1992. p. 135-49.

VITT, L. J.; VANGILDER, L. D. Ecology of a snake community in northeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 4, p. 273-296, 1983.

VITT, L.J. Diversity of reproductive strategies among Brazilian lizards and snakes: the significance of lineage and adaptation. In: Hamlett, W. C. (ed.). **Reproductive Biology of South American Vertebrates**, New York: Springer-Verlag; 1992. p.135-149.

VOLSØE, H. Structure and seasonal variation of the male reproductive organs of *Vipera berus* (L.). **Spolia Zool Mus Hauniensis**, v. 5, p. 1-157, 1944.

YAMANOUYE, N.; SILVEIRA, P. F.; ABDALLA, F. M .F.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; BRENO, M. C.; SALOMÃO, M. G. Reproductive cycle of the Neotropical *Crotalus durissus terrificus* : II. Establishment and maintenance of the uterine muscular twisting, a strategy for long-term sperm storage. **General Comparative Endocrinology**, v. 139, p. 151-157, 2004.

APÊNDICE

APÊNDICE A: Identificação dos espécimes de *Bothrops alternatus* analisados:

FUNED – Fundação Ezequiel Dias - 0019, 0020, 0026, 0029, 0701, 0979, 1400, 1429, 1644, 1761, 1839, 1841, 1956, 2390, 2392, 2399, 2401, 2417, 2446, 2453, 2454, 2516, 2519, 2523, 2534, 2558, 2584, 2605, 2700, 2782, 2783, 2784, 2802, 2811, 2812, 2828, 2829, 2830, 2831 .

PUC-MG – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais – 005, 3520.

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto - 343 S, 360 S, 416 S, 485 S, 487 S, 535 S, 537 S, 538 S, 539 S, 568 S, 572 S, 573 S, 574 S, 642 S, 664 S, 677 S, 712 S .

Coleção Herpetológica de Alfenas- 196, 491, 474, 522 ,519, 258, 513, 257, 008, 445, 321, 455, 465.

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais – 733, 731, 739.

MNRJ – Museu Nacional do Rio de Janeiro – 10.002, 14.207, 24.375, 21.672, 22.094, 8.602, 8.337.

IVB - Instituto Vital Brazil – 326, 372, 2764, 1476, 2547, 1160, 1516 .

IB – Instituto Butantan – 60013, 54962, 78872, 78000, 74042, 72735, 8623, 18970, 73575, 84797, 84796, 8950, 21660, 63506, 17962.

UNB – Universidade de Brasília – 19256, 19257, 19258, 19260, 19261, 19262, 19263, 19264, 19265, 19266, 19271.

UPF – Universidade de Passo Fundo – 247, 264, 346, 418, 840, 995, 1036, 1068, 1299, 1338, 1349, 1372, 1375, 1437, 1461, 1467, 1468, 1470, 1471,

1485, 1486, 1487, 1586, 1603, 1184, 826, 1026, 1034, 1046, 1253, 1401, 1489, 1704, 1717.

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria – 217, 273, 274, 278, 304, 387, 592, 611, 667, 763, 836, 950, 1132, 1373, 1378, 1387, 1616, 1637, 1975, 1986, 2397, 2398, 2424, 2449, 2598, 2625.

MCN – Museu de ciências Naturais de Porto Alegre – 7170, 10041, 10204, 10228, 10392, 10886, 10950, 10982, 11059, 11394, 12492, 12497, 12583, 12741, 12745, 12812, 14117, 15105, 15424, 15711, 16675.

APÊNDICE B: Localidades das análises:

Região A –

(continua)

Cidades	Estado	Latitude	Longitude	Nº serpentes	Coelção
Areado	MG	-21,359	-46,146	1	FUNED
Albertina	MG	-22,201	-46,616	2	IVB
Alfenas	MG	-21,429	-45,947	10	ALFENAS
Barbacena	MG	-21,226	-43,774	1	FUNED
Bom Sucesso	MG	-21,033	-44,758	1	PUC-MG
Brumadinho	MG	-20,143	-44,200	1	FUNED
Campos Gerais	MG	-21,235	-45,759	1	ALFENAS
Conceição do Rio Verde	MG	-21,881	-45,085	1	MNRJ
Conselheiro Lafaiete	MG	-20,660	-43,786	4	FUNED
Contagem	MG	-19,932	-44,054	1	FUNED
Entre Rios de Minas	MG	-20,671	-44,066	1	FUNED
Igarapé	MG	-20,070	-44,302	1	FUNED
Itaguara	MG	-20,392	-44,488	1	FUNED
Itajubá	MG	-22,426	-45,453	2	FUNED
Itapecerica	MG	-20,473	-45,126	4	FUNED
Itatiaiuçu	MG	-20,197	-44,421	1	FUNED
Itaúna	MG	-20,075	-44,576	20	FUNED
Lavras	MG	-21,245	-45,000	3	FUNED
Madre Deus de Minas	MG	-21,483	-44,330	2	ALFENAS
Nepomuceno	MG	-21,236	-45,236	1	FUNED
Ouro Branco	MG	-20,521	-43,692	11	UFOP
Pará de Minas	MG	-19,860	-44,608	1	FUNED
Pedro Leopoldo	MG	-19,618	-44,043	1	FUNED
Poços de Caldas	MG	-21,788	-46,561	1	UFMG
Pouso Alegre	MG	-22,230	-45,936	3	FUNED
Queluzito	MG	-20,740	-43,884	1	FUNED
Ribeirão das Neves	MG	-19,767	-44,087	1	FUNED
Santo Antônio do Amparo	MG	-20,946	-44,919	2	FUNED
São Braz de Suaçuí	MG	-20,625	-43,949	2	FUNED
São João del Rei	MG	-21,136	-44,262	2	FUNED
Sete Lagoas	MG	-19,466	-44,247	1	FUNED
Belo Horizonte	MG	-19,817	-43,956	1	PUC-MG
Tres Corações	MG	-21,697	-45,253	1	IVB
Varginha	MG	-21,551	-45,430	2	FUNED
Município desconhecido	MG	-19,817	-43,956	4	FUNED e Buta

(conclusão)					
Itatinga	SP	-23,102	-48,616	1	MNRJ
Botucatu	SP	-22,886	-48,445	2	MNRJ
Itapetininga	SP	-23,592	-48,053	1	MNRJ
Araraquara	SP	-21,794	-48,176	3	Buta
Município desconhecido	SP	-23,548	-46,636	2	Buta
Tres Rios	RJ	-22,117	-43,209	1	MNRJ
Castelândia	GO	-18,091	-50,201	1	IVB
Mineiros	GO	-17,569	-52,551	11	UNB
Terenos	MS	-20,442	-54,860	1	Buta
Três Lagoas	MS	-20,751	-51,678	1	Buta
Campo Grande	MS	-20,443	-54,646	1	Buta
Bataguçu	MS	-21,714	-52,422	1	Buta
Ponta Porã	MS	-22,536	-55,726	1	Buta
Nova Andradina	MS	-22,233	-53,343	1	Buta

Região B –

(continua)

Cidades	Estado	Latitude	Longitude	Nº serpentes	Coelção
Mangueirinha	PR	-25,941	-52,176	1	IVB
Município desconhecido	PR	-25,428	-49,273	2	IVB
Ilha de Terrapleno	RS	-32,042	-52,066	1	MNRJ
Alvorada	RS	-29,990	-51,084	1	MCN
Caçapava do Sul	RS	-30,512	-53,491	1	UFSM
Cacequi	RS	-29,884	-54,825	1	UFSM
Canoas	RS	-29,918	-51,184	1	MCN
Capela de Santana	RS	-29,700	-51,325	2	MCN
Carazinho	RS	-28,284	-52,786	3	UFPF
Porto Vera Cruz	RS	-27,736	-54,901	1	UFPF
Cruz Alta	RS	-28,639	-53,606	1	MCN
Eldorado do Sul	RS	-30,084	-51,616	1	MCN
Ernestina	RS	-28,499	-52,573	1	UFPF
Esteio	RS	-29,861	-51,179	2	MCN
General Câmara	RS	-29,905	-51,760	2	MCN
Gravataí	RS	-29,944	-50,992	1	MCN
Guabiju	RS	-28,541	-51,690	1	MCN
Guaíba	RS	-30,114	-51,325	1	MCN
Itaara	RS	-29,610	-53,765	1	UFSM
Júlio de Castilhos	RS	-29,227	-53,682	1	MCN

(conclusão)					
Lagoa Vermelha	RS	-28,209	-51,526	1	UFPF
Manoel Viana	RS	-29,589	-55,483	1	UFSM
Marau	RS	-28,449	-52,200	1	UFPF
Nicolau Vergueiro	RS	-28,536	-52,464	4	UFPF
Novo Hamburgo	RS	-29,678	-51,131	1	UFSM
Osório	RS	-29,887	-50,270	1	MCN
Passo Fundo	RS	-28,263	-52,407	20	UFPF
Quevedos	RS	-29,353	-54,072	2	UFSM
Rolador	RS	-28,258	-54,818	1	UFSM
Saldanha Marinho	RS	-28,393	-53,095	1	UFPF
Santa Maria	RS	-29,684	-53,807	15	UFSM
São Sepé	RS	-30,161	-53,565	2	UFSM
São Valentin	RS	-27,558	-52,524	1	UFPF
Tapes	RS	-30,673	-51,396	1	MCN
Taquari	RS	-29,800	-51,864	2	MCN
Viamão	RS	-30,081	-51,023	3	MCN
Victor Graeff	RS	-28,560	-52,748	1	UFPF

ANEXO

ANEXO A: Artigo submetido na revista Placenta

EXTRA-UTERINE PREGNANCY IN REPTILE SQUAMATA WITH IMPLANTATION

Amaral, F. M.^{1 2 3}; Federsoni, S.P.I.^{1 2}; Almeida-Santos, S. M.^{1 2}

¹ Programa de Pós- Graduação em Anatomia do Animais Domésticos e Silvestres, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

² Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil.

³ Corresponding author: fernanda.mmagno@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: The fertilization and embryonic development in Squamates occurs respectively in the infundibulum and in the glandular uterus. The embryos develop in separate chambers through a constriction, which acts as an implantation. Pregnancy in snakes brings to fetal membranes an even apposition with the uterus lining, forming the placental structures that maintain the embryo. **Methods:** Current paper focuses on two females of *Bothrops alternatus*, precisely on the embryonic development of five fetuses outside the uterus. The analyzes of gross morphology of the uterus was used, small fragments of tissues from the posterior portion of the uterus, serosa and infundibulum were taken of the females and the material from fetuses embedded in paraffin was retrieved for histological analyses. **Results:** These fetuses were fully formed (stage 43) and were found mummified in the pleuroperitoneal cavity. In the first case, they were implanted in the ovary wall, or rather, one was placed on the left and the other on right, proximal to the previous infundibulum. In the second case, the three fetuses were implanted on the outside of the uterine region (perimetrium). **Discussion:** The above reveals that it is possible to implant the extra-uterine embryo into other walls outside the uterine lumen. Ectopic pregnancy seems to have been possible since viviparous snakes have a complex pattern of embryonic nutrition with both a plesiomorphic (yolk) and a derived

(placenta) component .Since it embryos develops completely, viability is indicated. This is the first report showing the snake's extra-uterine embryos developing to term.

Keywords: squamates, mummification, fertilization, placenta, *Bothrops alternatus*.

INTRODUCTION

Reptilian placentas formed by simple apposition of fetal and maternal tissues contrast markedly with those of mammals. In most eutherians, tissues of the developing blastocyst implant invasively into the uterine endometrium or mucosa [1, 2, 3]. Although these placentas exchange gas, unlike their mammalian counterparts, they typically provide only small amounts of organic nutrients for development [4, 5, 6, 7].

Most viviparous squamates ovulate large, yolky eggs and have a conservative yolk sac and chorioallantoic placenta. The uterus may well exhibit regional differences in the structure, associated to different placental regions [3, 8].

Two sources of nutrient provision to embryos may be observed in reptiles. Through lecithotrophy, the embryos receive their nutrients predominantly from the yolk, supplied during vitellogenesis. Most reptiles, both viviparous and oviparous, exhibit lecithotrophy. The supply of nutrients via placenta is termed placentotrophy which may be observed in only a few reptilian species studied to date [9, 10, 11].

The uterus in the female snake is a conduit for the egg between ovulation and oviposition or parturition. The cranial region of the anterior oviduct is called the infundibulum and tends to be a slender, flaccid region [12]. It receives the ovulated egg from the ovary via a funnel-shaped ostium opening to the coelomic cavity. Prior to ovulation, the infundibulum migrates toward the ovary where the ostium surrounds the developing oocyte. The process has been observed in several species of squamates [13] and indicates that the ostium is ideally placed to receive the ovulated oocytes. However, the fertilization processes in reptiles are not well known and their

place of occurrence has yet to be determined. Fertilization presumably occurs before albumen or shell membranes cover the ovulated oocyte [3].

Since the relative constriction of the uterus between the eggs forms the incubation chambers, the entire surface of the egg virtually lies opposite the uterine mucosa, mostly separated by the vestigial shell membrane. Consequently, squamates achieve the functional equivalent of ovum-implantation, in spite of the absence of specializations allowing embryonic invasion of the uterine mucosa [8]. Numerous blood vessels present at the base of the epithelium [4,14] allow the maternal blood supply to be very close to the fetal blood supply. However, there is only scanty information on the exact sites of the physiological exchange or how the oviduct mediates the transfer [3].

The species of genus *Bothrops* (Viperidae) is a viviparous, mainly lecithotrophic species, with a chorioallantoic placenta [15]. Placental structure in *B. alternatus* is similar to that observed in *B. jararaca*. The placental structure in *B. alternatus* is accompanied by thinning and abundant vascularization of the uterine wall. Placentae of snakes sustain developing embryos by gas exchange, provision of water and nutrients and excretion of nitrogen wastes [7].

Since the viviparous lizard, *Pseudomoia entrecasteauxii*, exhibits non-invasive epitheliochorial placentation, the extra-uterine embryo does not invade maternal tissue [16]. We used this discovery as well to test if the embryonic membranes of viviparous snake *B. alternates* have the ability to invade non-uterine maternal tissues.

Current research describes an extra-uterine pregnancy in *Bothrops alternatus* with epitheliochorial placentation, which exhibits invasive embryonic tissues when ectopic.

MATERIALS AND METHODS

Pregnant females of *Bothrops alternatus* were retrieved from the scientific collection of the Ezequiel Dias Foundation (FUNED), in Belo Horizonte MG Brazil. Several female snakes were still alive but were euthanized by an intracardiac application of T61 (following euthanasia protocol of the committee for ethics in animal experimentation of the FUNED). A ventral incision through two thirds of the serpents' back was made to study gross anatomy morphology.

Fetuses were ectopic in two snakes. The gross morphology of the uterus was used, according to the terminology by Girling [3]. Small fragments of tissues from the posterior portion of the uterus, serosa (perimetrium) and infundibulum were taken so that the material could be analyzed; similarly, material from fetuses embedded in paraffin was retrieved for histological analyses. Further, 5 μ m tissues were cut with microtomes, mounted on glass slides, and stained with standard hematoxylin-eosin (HE) techniques. Histological cuts of the umbilical cord found in the fetuses and of blood vessels near to the fetuses were performed to study maternal-fetal vascularization.

Fetuses were photographed with camera Canon SX30 IS and the anatomical structures were seen macroscopically and under a magnifying glass and stereoscope microscope. The microscope images were taken by the photograph system of microscope Olympus BX51 coupled to the morphometric analysis of program Image-Pro Express Olympus.

The females featuring extra-uterine pregnancy were called Female 1 and Female 2, respectively.

RESULTS

Female 1 (Table 1) revealed two fetuses in the proximal section of the anterior infundibulum, one located on the left and the other on the right. The fetuses were completely developed (stage 43) [17] and were implanted on the ovary's external wall (Fig. 1). The encapsulated fetuses measured 170 mm and 225 mm. Empty sperm storage receptacles could be seen when a histological cut was made in the female's infundibulum.

There were three fetuses on the right side of the oviduct of Female 2 (Table 1). The fetuses were completely developed (stage 43) [17] and had been implanted on the external wall of the right uterus (Fig. 2). These encapsulated fetuses featured an advanced mummification stage.

Embryo implantation chambers and corpus albicans could be observed respectively in the uterus and in the ovaries in Females 1 and 2.

Table 1: Biometric and body data of pregnant females and their fetuses.

	Female 1	Female 2
SVL / Female's Body Mass	1050 mm 771.9 g	1133 mm 981.7 g
Date of death of females	Dec 13, 2011	Jan 23, 2009
Number of follicles - V1	26	22
Number of follicles - V2	0	0
Presence of corpus albicans	Yes	Yes
Location of fetuses	1- right ovary 2- left ovary	1- Right uterus 2- Right uterus 3 Right uterus
Stage of development of the fetus (Hubert, J.; Dufaure, 1968)	43	43
Sex of fetuses	1- male 2- male	-----

Legend: V1 = primary vitellogenesis; V2 = secondary vitellogenesis.

FIGURE 1: Case 1 of ectopic pregnancy.

Legend: IA= anterior infundibulum; IP= posterior infundibulum; UG= glandular uterus; UA= aglandular uterus; OV= ovary; PO= pouch; V= vascularization; Asterisk= fetus; F= primary follicles; CA= corpus albicans. A- two fetuses in the extrauterine cavity, implanted on the extra-ovarian wall, at the right and at the left. B- left fetus revealing ovarian vascularization and participating the embryo's nutrition. C- fetuses of the female 1. D- right fetus with primary follicle close of its body, revealing nidation on the ovary's external wall. E- more details of the left fetus implanted on the extra-ovarian wall.

FIGURE 2: Case 2 of ectopic pregnancy

Legend: I= Infundibulum; UG= glandular uterus; OV= ovary; VA= vagina; asterisk= fetus. A- three fetuses implanted on the right extrauterine wall. B- female reproductive apparatus of Female 2, with fetuses in the right coelomatic cavity.

Since Female 1 was euthanized prior to dissection, or rather, when the body was still warm, the material, which included the embryos, was in good conditions for histological and morphological analyses than that of Female 1. In fact, the veins and arteries which probably participated in the maternal-fetal gas exchange linked to the umbilical cord of the embryos/fetuses of Female 1 could be observed (Figure 3). Further, Figure 3 shows the tissue involving the fetuses (arrow) with a thin layer adherent to the fibrous tissue which may have been remnants of extra-embryonic membranes.

FIGURE 3: Embryonic vascularization in Female 1.

Legend: 1 = vein; 2 = ven; 3 = artery; 4 = vein; asterisk = vitelline trunk; arrow = extraembryonic membrane + envelope made of fibrous conjunctive tissue.

Fetuses of Females 1 and 2 were encapsulated in a membrane made of fibrous conjunctive tissue. Histological analyses on Female 1 showed a section of the ovarian stroma close to the enveloped conjunctive tissue. This fact corroborated the hypothesis that the embryo was implanted on the external wall of the ovary.

Several seminal vessels and receptacles storage were reported in the posterior uterine region and infundibulum, respectively, but no sperm was detected.

DISCUSSION

Viviparity in vertebrates is the reproductive strategy by which females retain fertilized eggs in their reproductive tracts and give birth to their offspring. In viviparous squamate reptiles, the eggs develop to term in the oviduct [7].

A recent publication on ectopic pregnancy in the skink (*Pseudemoia entrecasteauxii*) reported an extra-uterine pregnancy without the implantation of embryos [16]. The process is known in reptiles and current paper is the first report of ectopic pregnancy in snakes.

Cuellar [13] observed that in the ovulation process, in which the associated mesentery surrounds the ovary, the egg is shed directly into the infundibulum and does not fall into the peritoneal cavity. However, there are several registers of unfertilized eggs in the peritoneal cavity (ectopic) of oviparous and viviparous squamates. Consequently, the process of egg uptake is far from infallible [18].

The case of Female 1 corroborates the hypothesis that the infundibulum migrates toward the oocytes to arrest them in the ovary, which would explain the fertilization on the ovary or uterine walls, since the sperm would be in the infundibulum region [12].

Girling [3] suggests that fertilization must occur either in the infundibulum or in the uterine tube, while sperm has been observed in storage sites in the two regions. Infundibulum sperm receptacles were reported in *B. alternatus* (Amaral, F. M. personal communications). However, since there were no spermatozooids in the storage containers of the infundibulum of Female 1, it may be inferred that the female had mated recently, stored the spermatozooids in the receptacles and fertilization occurred in the follicles, with the posterior production of embryos and births.

Ectopic or extra-uterine pregnancy denotes a pregnancy occurring elsewhere than in the cavity of the uterus [19]. Ectopic pregnancy may be primary or secondary [20, 21]. The former occurs when there is direct nidation on the peritoneal serosa, or rather, when a mature follicle, which cannot be caught by the infundibulum, is fertilized in the abdominal cavity and develops on that site. This may have occurred in Female 1 due to the closeness of the embryos to the infundibulum and ovary. The

secondary ectopic pregnancy consists of the implantation of the egg in the uterus but, due to an external trauma or internal pressure [22], the embryos/fetuses are expelled from the uterus and re-implanted on the gestational sac in the pleuroperitoneal serosa. This may have been the case in Female 2, due to the fact that there was an implantation on the distal uterine wall.

However, the establishment of the difference between primary and secondary ectopic pregnancy forms requires histological studies of placentation, mummified fetus and either a ruptured uterus or oviduct [23]. It is known that the myometrium may be regenerated, with little or no scar tissues, which may explain the absence of a uterine scar in some cases [24, 25]. In fact, the causes and mechanisms of an ectopic implantation of the ovum cells in animals are not equally or always clearly defined [26].

Ectopic pregnancy seems to have been possible since viviparous snakes have a complex pattern of embryonic nutrition with both a plesiomorphic (yolk) and a derived (placenta) component [7].

The post-ovulation supply of nutrients to the embryo is transferred from the oviduct by at least one of the extra-embryonic membranes [27, 28]. Four extra-embryonic annexes are developed when the endometrial tissue is prepared by the corpus luteum: three annexes envelope the embryo and one nourishes the embryo/fetus during pregnancy. The structural relationship between the oviduct and the extra-embryonic membranes evolve a fifth embryonic annex, the placenta, defined as a close juxtaposition or fusion of fetal organs to the material tissues for physiological exchanges [29].

The placenta is vital for water and gas exchange, and potentially for inorganic and organic nutrient exchange between maternal and fetal tissues [30]. However, little is known on the exact sites of the physiological exchange or how the oviduct mediates the transfer. The supply of exchanges with the uterine tissue in ectopic pregnancy occurs when the embryo is implanted on another tissue, as occurred in the two cases of ectopic pregnancy in current study. The first case reveals implantation of the embryos on the ovary's external wall, while in the second case implantation occurred on the external wall of the uterus. Implantation occurs even in ectopic pregnancy, contrastingly to results by Griffith et al. [16], who described an ectopic pregnancy without implantation in the skink.

All studies on mammalian ectopic pregnancy dealt with mummified fetuses, although size and bone structures of several of them indicated that they might have been viable [31]. The extra-uterine embryo, described in current analysis, lies in layers of fiber conjunctive tissues, in the normal delivery of the other fetuses in the uterus, was produced in the coelomatic region within an encapsulation event. There is also a thin layer between the fibrous tissue and the fetus, which may be the remnants of extra-embryonic membranes.

Since the two females analyzed in current study have implantation chambers in the uterine lumen, they may have recently delivered their offspring by normal pregnancy, which is corroborated by the presence of the corpus albicans, taking into consideration that the corpus luteum secretes the progesterone with its role as a hormone that maintains pregnancy [3, 32]. The corpus luteum, which in postpartum females turns into a scar called corpus albicans (present in the two females in current study), with the presence of either the conceptus or a mummified fetus, is always kept during the development, indicating a fetal-maternal endocrine relationship [33].

The chorioallantoic placenta, typical of Viperidae [34], has diffused, indeciduous and highly vascularized scales [8, 35, 36].

The umbilical cord connects the fetus and the placenta. Arteries and umbilical and vitelline veins pass through it, respectively carrying to and bringing the blood of the fetus from the placenta. The umbilical cord is thus the set of vessels and ducts that transport the required maternal substances for the development of the fetus [30, 37].

Jones et al. [38] suggested that the close relationship of the secondary oviductal artery and vein might allow for countercurrent transfer between the vessels, allowing delivery of ovarian factors to the uterus. The anterior portion of the squamate oviduct is commonly supplied by an artery that also supplies and traverses the ovary [30, 39]. Consequently, examination of the ovarian microvasculature might prove revealing. The nutrition of embryos in the extra-uterine cavity (ovary wall, uterus, serosa) was thus possible.

The generalization that squamate placentas are non-invasive has been confirmed through numerous studies of placental microscopy. Early light microscopic studies of a few viviparous lizards and snakes claimed that uterine (oviductal) tissues are eroded to expose maternal capillaries to the fetal membranes [40, 41]. However, subsequent research on several species has refuted these claims [8, 42, 43, 44, 45].

Moreover, fetuses of the female *B. alternatus* invaded maternal tissue (ovary and serosa) because they were implanted outside the uterus.

Current investigation evidence through macro and microscopic morphology, topology and vascularization that placentotrophic snakes' embryos (as in *Bothrops alternatus*) with extra-uterine pregnancy, are capable of implanting and invading other maternal tissues such as the ovary and uterus (serosa).

Acknowledgements

We thank Giselle Cotta and Flávia Cappuccio de Resende for allowing access to collection (FUNED). The all Squamata Reproduction Research Group for the comments and help which improved this paper.

References

- [1] Wimsatt WA. Some comparative aspects of implantation. *Biol Reprod* 1975;12(1)40.
- [2] Mossman HW. *Vertebrate Fetal Membranes*. New Brunswick, New Jersey: Rutgers University Press. 1987;383p.
- [3] Girling JE. The reptilian oviduct: A review of structure and function and directions for future research. *Journal of Experimental Zoology*, 2002;293:141-170.
- [4] Stewart JR. Placental structure and nutritional provision to embryos in predominantly lecithotrophic viviparous reptiles. *Am Zool* 1992;32:303–312.
- [5] Stewart JR, Thompson MB. Evolution of placentation among squamate reptiles: Recent research and future directions. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2000;127:411– 431.
- [6] Thompson MB, Adams SM, Herbert JF, Biazik JM, Murphy CR. Placental function in lizards. *Int Cong Ser* 2004;218– 225.
- [7] Blackburn DG, Stewart JR. Viviparity and placentation in snakes. In: Aldrich RD, Sever DM, (eds). *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*. Enfield, NH: Science Publishers. 2011, p. 119–181.
- [8] Blackburn DG. Choriollantoic placentation in squamate reptiles; structure, function, development, and evolution. *The Journal of Experimental Zoology* 1993;266:414-430.
- [9] Blackburn DG, Vitt LJ, Beauchat CA. Eutherian-like reproductive specializations in a viviparous reptiles. *Proceedings National Academic Science* 1984;81:4869-4863.

- [10] Thompson MB, Stewart JR. Egg and clutch size of the viviparous Australian skink, *Pseudemoia pagenstecheri* and the identity of species with Type III allantoplacentae. *Journal of Herpetology* 1994;28:519-521.
- [11] Thompson MB, Speake BK, Stewart JR, Russell KJ, McCartney RJ, Surai PF. Placental nutrition in the viviparous lizard *Niveoscincus metallicus*: The influence of placental type. *J Exp Biol* 1999;202:2985-2992.
- [12] Seigel DS, Miralles A, Chabbarria RE, Aldridge RD. Female Reproductive Anatomy: Cloaca, Oviduct, and Sperm Storage. In: Aldridge RD, Sever DM. (eds). *Reproductive biology and phylogeny of snakes*. Florida, CRC Press, 2011;9:347-409.
- [13] Cuellar O. Egg transport in lizards. *Journal of Morphology* 1970;130:129-136.
- [14] Boyd MMM. The oviduct, foetal membranes, and placentation in *Hoplodactylus maculatus* Gray. *Proc Zool Soc Lond* 1942;112:65-104.
- [15] Almeida-Santos SM, Miglino MA. Chorioallantoic Placentation in Viperid Snakes In: *International Federation of Placenta Association*. Whistler, Placenta 2013;34:A1-199:A59.
- [16] Griffith & Thompson. No implantation in an extra-uterine pregnancy of a placentotrophic reptile. *Placenta* 2013;34:510-511.
- [17] Hubert J, Dufaure. Table de développement de la vipère aspic: *Vipera aspis*. *Le bulletin de la société zoologique de France* 1968;93:1:135–148.
- [18] Blackburn DG. Structure function and evolution of the oviducts of squamate reptiles, with special, reference to viviparity and placentation. *The Journal of Experimental Zoology* 1998; 282:560-617.
- [19] Peters LJ. Abdominal pregnancy in a golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Laboratory Animal Science* 1982;32:392–393.
- [20] Chaves-Neto H. *Obstetrícia básica*. São Paulo: Atheneu, 2005.
- [21] Neme B. *Obstetrícia básica*. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2005.
- [22] Owensby T, Jackson K, Scharf B. Failure to deliver in a rabbit with intra-abdominal masses. *Laboratory Animal* 2001;30:23–25.
- [23] Nack RA. Theriogenology question of the month. An ectopic fetus. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2000;217:182–184.
- [24] Bunte RM, Hildebrandt PK. Abdominal mummified fetus in an owl monkey. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1975;167:667–668.
- [25] Segura GP, Peris PB, Martinez MJ, Ortega PJ, Corpa AJM. Abdominal pregnancies in farm rabbits. *Theriogenology* 2004;62:642–651.

- [26] De Cecco L, Capitanio GL, Croce S, Forcucci M, Gerbaldo D, Rissone R. Biology of nidation and ectopic implantation. *Acta Europaea Fertilitatis* 1984;15:347–355.
- [27] Luckett WP. Ontogeny of amniote fetal membranes and their application to phylogeny. In: Hecht MK, Goody PC, Hecht BM. (Eds.). *Major Patterns in Vertebrate Evolution*. New York: Plenum Press, 1977, p. 439-516.
- [28] Stewart JR. Morphology and evolution of the egg of oviparous amniotes. In: Sumida SS, Martin KLM. (Eds.). *Amniote Origins*. San Diego: Academic Press; 1997. p. 291-326.
- [29] Mossman HW. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Carnegie of Institute Contributions Embryology* 1937;26:129-246.
- [30] Yaron Z. Reptilian placentation and gestation: structure, function, and endocrine control. In: Gans C, Billet F. (Eds.). *Biology of the reptilia*, New York: Wiley; 1985, p. 529- 694.
- [31] Corpa JM, Segura P, Martínez J, Ortega J, Peris B. Abdominal pregnancies in farm rabbits. *Proceedings - 8th World Rabbit Congress –September 7-10, 2004 – Puebla, Mexico*.
- [32] Almeida-Santos SM, Abdalla FMF, Silveira PF, Yamanouye N, Breno MC, Salomão MG. Reproductive cycle of the Neotropical *Crotalus durissus terrificus*: I. Seasonal levels and interplay between steroid hormones and vasotocinase. *General and Comparative Endocrinology* 2004;139:143-150.
- [33] Madani MO, Tirgari M. Extrauterine pregnancy in a ewe. *Veterinary Record* 1984;115:547–548.
- [34] Bellairs R, Griffiths I, Bellairs ADA. Placentation in the adder, *Vipera berus*. *Nature* 1955;176:657- 659.
- [35] Weekes HC. A review of placentation among reptiles, with particular regard to the function and evolution of the palcenta. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1935;2:625-645.
- [36] Almeida-Santos SM, Orsi AM. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morfologia e função do oviduto. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2002;26:109-112.
- [37] Almeida-Santos SM. Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). PhD Thesis. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2005.
- [38] Jones RE, Summers CH, Austin HB, Smith HM, Gleeson TT. Ovarian, oviductal, and adrenal vascular connections in female lizards (genus *Anolis*). *Anat. Rec.* 1983;206:247–255.

- [39] Robb J. The internal anatomy of *Typhlops* Schneider (Reptilia). Aust. J. Zool. 1960;8:181–216.
- [40] Weekes HC. Placentation and other phenomena in the scincid lizard *Lygosoma (hinulia) quoyi*. Proceedings of the Linnaean Society of New York 1927;52:499-554.
- [41] Clark H, Florio B, Hurowitz R. Embryonic growth of *Thamnophis sirtalis* in relation to fertilization date and placental function. Copeia 1955:9–13.
- [42] Blackburn DG, Stewart JR, Baxter DC, Hoffman LH. Placentation in garter snakes. Scanning EM of the placental membranes of *Thamnophis ordinoides* and *T. sirtalis*. J Morphol 2002;252:263–275.
- [43] Blackburn DG, Lorenz R. Placentation in garter snakes Part II. Transmission EM of the chorioallantoic placenta of *Thamnophis radix* and *T. sirtalis*. J Morphol 2003;256:171–186.
- [44] Blackburn DG, Anderson KE, Johnson AR, Knight SR, Gavelis GS. Histology and ultrastructure of the placental membranes of the viviparous brown snake, *Storeria dekayi* (Colubridae: Natricinae). J Morphol 2009;270:1137–1154.
- [45] Murphy BM, Parker SL, Murphy CR, Thompson MB. Placentation in the eastern water skink (*Eulamprus quoyii*): A placentome-like structure in a lecithotrophic lizard. J Anat 2011;218:678–689.

3 DIMORFISMO SEXUAL, DIFERENÇA DE TAMANHOS INTERPOPULACIONAIS E ATIVIDADE SAZONAL DE *Bothrops alternatus*

3.1 INTRODUÇÃO

Estudos sobre história natural são fundamentais para várias áreas da biologia, incluindo a ecologia, evolução e conservação das espécies (GREENE; LOSOS, 1988; HILLIS, 1995). A história natural tem seu foco no organismo, sua distribuição geográfica, habitats, seus hábitos e suas interações com o meio ambiente (GREENE, 1994). Os dados de estudos ecológicos também são importantes para o melhor entendimento de relações filogenéticas entre grupos de serpentes e assim descobrir padrões e processos que envolvem traços morfológicos, ecológicos e comportamentais em diversos gêneros (MARTINS; MARQUES; SAZIMA, 2002).

O dimorfismo sexual no tamanho do corpo (CRC) e da cauda (CC), normalmente é observado entre as espécies do gênero *Bothrops* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002). Em algumas espécies deste gênero as fêmeas apresentam maiores tamanhos corporais e machos caudas maiores, como no caso de *B. atrox* (SILVA, 2015), *B. asper* (SOLÓRZANO; CERDAS, 1989), *B. itapetiningae* (VALDUJO et al., 1999); *B. jararaca* (JANEIRO-CINQUINI et al., 1992, KASPEROVICZUS, 2013), *B. jararacussu* (MARQUES, 1998), *B. moojeni* (LELOUP, 1975, NOGUEIRA; VALDUJO, 1999).

Geralmente as fêmeas apresentam maior comprimento rostro-cloacal (CRC) que os machos, o que pode estar relacionado com seu sucesso reprodutivo (SEMLITSCH; GIBBONS, 1982; SHINE, 1994; ZUG, 2001). E as diferenças no tamanho da cauda também são comuns, indicando que os machos possuem caudas mais longas para acomodar o hemipênis e os músculos retratores (KLAUBER, 1943; CLARK, 1966; KING, 1989).

Para espécies com ampla distribuição geográfica e que podem apresentar variação na dieta, como o tipo, a disponibilidade e o tamanho da presa ao longo da

área de distribuição dessa espécie, a alimentação pode ser a principal responsável pela diferença de tamanhos interpopulacionais (SHINE, 1989).

Outra questão de grande importância para os estudos ecológicos é o padrão de atividade. Fatores abióticos, como umidade e temperatura, influenciam diretamente no metabolismo das serpentes e, conseqüentemente, na sua atividade sazonal (LILLYWHITE, 1987). Além disso, relações filogenéticas podem controlar os padrões de atividade, assim como a tolerância de certas espécies à baixas temperaturas (MARQUES; ETEROVIC; ENDO, 2001). De um modo geral, essas atividades estão relacionadas à alimentação, termorregulação e, principalmente, reprodução (ROJAS; GONÇALVES; ALMEIDA-SANTOS, 2007).

Dessa forma a análise da relação entre variáveis ambientais e biológicas do animal poderá ser utilizada para definição dos padrões de atividade sazonal.

3.2 MATERIAL E MÉTODO

3.2.1 Coleta de dados

Para análise de dados ecológicos da serpente *Bothrops alternatus* foram coletados dados de espécimes tombadas nas seguintes coleções herpetológicas do Brasil: Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG), Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Museu de Ciências Naturais da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Instituto Vital Brasil (IVB), Instituto Butantan (IB), Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ), Universidade de Brasília (UNB), Coleção de Herpetologia da Universidade Federal de Santa Maria (ZUFMS), Universidade de Passo Fundo (UPF) e Coleção de Répteis do Museu de Ciências Naturais (FZBRS) (Apêndice A).

Além disso, para determinar o padrão de atividade sazonal, além dos dados dos animais tombados nas coleções científicas, foram levantados os dados de entrada de animais recebidos no Serviço de Animais Peçonhentos da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) entre 1990 e 2011 e a entrada dessa serpente no Serviço de Herpetologia do Instituto Butantan (IB) entre 1914 a 2014.

As populações foram divididas da seguinte forma: região A: serpentes que habitavam o centro-oeste e sudeste do Brasil; e região B: serpentes da região sul do Brasil.

3.2.2 Dimorfismo sexual e diferença de tamanhos interpopulacionais

Para avaliar o dimorfismo sexual utilizou-se os dados biométricos, tais como CRC (comprimento rostro-cloacal) e CC (comprimento da cauda) das serpentes. O dimorfismo sexual no tamanho do corpo (CRC), foi testado por teste-*t* de Student (ZAR, 1999). As análises foram realizadas no programa Instat, com $P < 0,05$ como critério de significância. As médias de CRC e CC foram comparadas entre machos e fêmeas, somente em adultos, a fim de se evitar problemas relacionados a mudanças ontogenéticas na forma do corpo (KING, 1989). Para comparar o índice de dimorfismo sexual entre indivíduos adultos em relação ao tamanho corporal utilizou-se a fórmula: $SSD = 1 - [\text{CRC médio dos adultos do sexo de maior tamanho} / \text{CRC médio dos adultos do sexo de menor tamanho}]$ conforme Shine (1994). Sendo, por convenção, resultados negativos representando machos maiores que fêmeas e valores positivos, fêmeas maiores que machos.

Para análises do CC, foram utilizadas análises de covariância (ANCOVA), para as duas populações, de forma a eliminar o efeito do tamanho do corpo para cada variável (MARTINS et al., 2001). E utilizou-se ANCOVA, porque análises preliminares mostraram que o CRC foi correlacionado com o CC ($r = 0,4863$; $P = 0,000006$; $r = 0,4606$; $P = 0,00001$). Desta forma, foi utilizada como variável dependente o CC, e como co-variável o CRC. Todas as variáveis morfológicas foram transformadas em seu logaritmo natural (ZAR, 1999).

Já para comparações de CRC e CC entre as populações foram utilizadas análises pelo test-t de Student, quando, as variáveis não passaram no teste de normalidade foi realizado um teste não paramétrico Mann-Whitney.

3.2.3 Atividade

Verificou-se se o padrão de atividade anual de adultos e juvenis é influenciado pelos eventos reprodutivos e climáticos. Foram construídos histogramas, mostrando a diferença de atividade sazonal entre serpentes adultas e jovens, assim como entre fêmeas e machos em diferentes épocas do ano. Foram feitas análises entre os padrões de atividades e os ciclos reprodutivos de fêmeas e machos e relações entre o período de acasalamento, parturição e aumento de jovens na população. Essa relação permitiu observar se a reprodução tem alguma influência no padrão de atividade sazonal destas serpentes.

Para análise do padrão de atividade e para verificar possíveis diferenças na frequência de indivíduos nas estações do ano (primavera, verão, outono e inverno) foi utilizado o teste do qui-quadrado.

3.3 RESULTADOS

Foi encontrado dimorfismo sexual no comprimento rostro-cloacal e comprimento da cauda em indivíduos adultos de *B. alternatus*, com fêmeas apresentando maior tamanho corporal (região A: $t = 10,329$; $gl = 77$; $P < 0.0001$; região B: $t = 8,874$; $gl = 80$; $P < 0.0001$) e machos apresentando caudas maiores (Figura 35) (ANCOVA, região A: $F_{(1,75)} = 64,833$; $P = 0,0000$; região B: $F_{(1,79)} = 46,630$; $P = 0,0000$). O índice de dimorfismo sexual (SSD) foi de 0,07 na Região A, e 0,83 na Região B, o que significa que as fêmeas, em ambas regiões, são maiores que os machos, logo, provavelmente não há combate nesta espécie.

Em relação à maturidade sexual, o menor macho sexualmente maduro possuía 419 mm de CRC (Região A) e 422 mm de CRC (Região B), apresentando ductos deferentes enovelados e com espermatozoides no lúmen. Já a menor fêmea madura apresentou 650 mm de CRC (Região A) e 640 mm de CRC (Região B), contendo folículos em vitelogênese secundária.

Comparando-se o CRC e CC, de fêmeas e machos entre as populações das regiões A e B, não foram observadas diferenças significativas nos valores dos tamanhos corporais, com exceção do CRC dos machos que apresentaram-se significativos, com os machos da Região B maiores (Tabela 1).

Figura 35 - Diferença de tamanhos das caudas entre fêmeas e machos de *Bothrops alternatus*

Legenda: Macho (**M**) e fêmea (**F**).
Foto: Fernanda Magno Amaral (2014).

Tabela 1 - Diferença de tamanhos – CRC e CC – de fêmeas e machos entre as populações (Região A e Região B)

	REGIÃO A	REGIÃO B	Valores estatísticos
Fêmeas	(n=42)	(n=47)	
CRC (mm)	2965	3020	($t = 1,026$; $gl = 87$; $P = 0,3076$)
CC (mm)	1959	1981	($t = 0,4492$; $gl = 86$; $P = 0,6544$)
Machos	(n=39)	(n=35)	
CRC (mm)	2794	2850	($U = 481,50$; $P = 0,0300$)
CC (mm)	1759	1976	($U = 573,00$; $P = 0,3124$)

Fonte: Fernanda Magno Amaral (2015).

Para atividade total dos adultos das serpentes, da região A, foi encontrado uma diferença significativa entre o outono e o inverno ($P < 0,0001$), entre o verão e a primavera ($P < 0,0001$) e entre o outono e a primavera ($P < 0,0001$). Desta forma, as serpentes de *Bothrops alternatus* estão mais ativas no verão e no outono e menos ativas no inverno e na primavera (Figura 36).

Figura 36 - Histograma da atividade total de serpentes *Bothrops alternatus* adultas da Região A

Fonte: Fernanda Magno Amara (2015).

Para as serpentes da região B, houve uma diferença significativa, no padrão de atividade total dos adultos, somente entre as estações do verão e outono ($P = 0,0311$). Entre outono e inverno ($P = 0,2563$), inverno e primavera ($P = 0,4183$), verão e primavera ($P = 0,0852$) e outono e primavera ($P = 0,7463$) não apresentaram diferenças significativas. Com isso, nesta região, as serpentes apresentam-se mais ativas no outono e menos ativas no verão (Figura 37).

Figura 37 - Histograma da atividade total de serpentes *Bothrops alternatus* adultas da Região B

Fonte: Fernanda Magno Amara (2015).

A respeito da atividade total dos filhotes de urutu cruzeiro não foi possível a aplicação de testes estatísticos pelo fato no N de amostragem ter sido baixa. Contudo, é possível notar uma diferença entre os padrões de atividade sazonal destes indivíduos.

Tanto na Região A como na Região B houve uma abundância maior de filhotes nas estações do verão e do outono (Figuras 38 e 39).

Figura 38 - Histograma da atividade total de filhotes de *Bothrops alternatus* da Região A

Fonte: Fernanda Magno Amara (2015).

Figura 39 - Histograma da atividade total de filhotes de *Bothrops alternatus* da Região B

Fonte: Fernanda Magno Amara (2015).

3.4 DISCUSSÃO

Os machos de *Bothrops alternatus* atingem a maturidade sexual com menores tamanhos corporais que as fêmeas. Essa característica também foi observada para outras espécies do gênero *Bothrops* (VALDUJO; NOGUEIRA; MARTINS, 2002; HARTMANN; MARQUES; ALMEIDA-SANTOS, 2004; NUNES et al., 2010; BARROS, 2011; MATIAS et al., 2011; KASPEROVICZUS, 2013; SILVA, 2015). Esta espécie também apresenta dimorfismo sexual, sendo as fêmeas maiores que os machos, tanto na Região A quanto na Região B. O fato das fêmeas possuírem maiores tamanhos corporais e alcançarem a maturidade sexual tardiamente em relação aos machos está relacionada aos benefícios reprodutivos, o qual aumentariam as possibilidades de gerar mais descendentes, ou seja, aumento da fecundidade, assim sendo uma vantagem para as fêmeas desta espécie (SEIGEL; FITCH, 1984; SHINE, 1993; 1994). Além disso, segundo Shine (1994), o aumento no tamanho corpóreo das fêmeas apresenta uma relação direta com a evolução da viviparidade, assim permitindo as maiores fêmeas produzirem maiores ninhadas (SHINE, 1994). E para os machos, a vantagem seria a alta taxa de mobilidade e maior deslocamento, oportunizando o aumento do número de cópulas aos machos que possuem menores tamanhos (SHINE, 1978).

O menor comprimento do macho geralmente está relacionado à ausência de combate (SHINE, 1986, 1994). Por meio do cálculo do índice de dimorfismo sexual (SSD) foi constatado que, provavelmente, nesta espécie não há combate, pois os valores, tanto para a Região A quanto para a B, foram positivos (0,07 e 0,83, respectivamente). Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Bothrops*, o comportamento de combate parece ser restrito somente às espécies *B. atrox*, *B. leucurus*, *B. moojeni* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002).

Em relação a diferença de tamanhos (CRC) entre as populações das duas regiões, somente entre os machos houve diferença significativa no tamanho corporal. Os machos da Região B apresentaram o CRC maior em comparação aos machos da Região A.

Independentemente dos componentes do ciclo reprodutivo de ambos os sexos, estar preparado para o acasalamento geraria um custo substancial de energia. Esse custo reprodutivo incluiria nas fêmeas e nos machos a necessidade de adquirir energia (e.g., procura por alimento para reserva de gordura corpórea), utilizada na produção de gametas e hormônios sexuais (PLUMMER, 1983; AUBRET et al., 2002). Essa energia necessária para arcar com os processos fisiológicos da reprodução provoca mudanças na atividade sazonal das espécies. De um modo geral, essas atividades estão relacionadas à alimentação, tolerância às condições climáticas, termorregulação e, principalmente, à reprodução (ROJAS; GONÇALVES; ALMEIDA-SANTOS, 2007). Os processos fisiológicos reprodutivos estão diretamente relacionados à atividade sazonal, pois as serpentes estão mais ativas na época da cópula (SEIGEL; FORD, 1987) e ainda em busca de locais favoráveis para oviposição ou parturição, por exemplo. Uma vez que a possibilidade de reprodução depende do status nutricional dos indivíduos (STEARNS, 1992), é natural que as serpentes estejam muito ativas no período pré-reprodutivo, principalmente forrageando (SALOMÃO et al., 1995).

O gráfico de atividade total da Região A mostra que os adultos de *B. alternatus* estão mais ativos durante o verão e outono. Fêmeas reprodutivas estão termorregulando, ao mesmo tempo em que estão mais pesadas devido à presença de ovos e embriões no oviduto no verão e outono (SAZIMA, 1988). Já as fêmeas não reprodutivas, devem aumentar sua atividade sazonal à procura de alimento (HOUSTON et al., 2007), principalmente no verão. Visto que necessitariam de alimento para o acúmulo de gordura destinado aos eventos reprodutivos em seu próximo ano (BONNET et al., 2000; HOUSTON et al., 2007).

Machos adultos estão mais ativos no outono e se deslocam mais para procurar por fêmeas para o acasalamento (ALDRIDGE; DUVALL, 2002). Verão e outono é a época dos nascimentos, aumentando significativamente a abundância desses animais. As menores taxas de atividades foram registradas no inverno. Segundo Sazima (1988) a baixa temperatura associada principalmente aos meses de junho e julho na região Sul e Sudeste, faz com que as serpentes permaneçam a maior parte do tempo em abrigos. Portanto, para *B. alternatus* para da região Sul (Região B), esses padrões de atividade foram bem diferentes em relação aos adultos. Foi observada uma abundância maior no outono, no inverno e na

primavera. O verão, por sua vez, apresentou um número menor de serpentes. Esse fato pode ser explicado por essas serpentes estarem bem adaptadas ao clima frio. Tendo em vista que seus ancestrais tiveram origem em climas com temperaturas mais frias (ARAÚJO, 2015). Desta forma, devem estar melhor adaptadas ao clima, permitindo, assim, melhor forrageio, termorregulação e busca por parceiros para a cópula. A primavera, é a estação onde ocorre a gestação (AMARAL; ALMEIDA-SANTOS, [2015] em fase de elaboração), então fêmeas podem estar em busca de locais favoráveis para a parturição e machos forrageando, alimentando-se e se preparando para a espermatogênese.

Os padrão de atividade sazonal dos filhotes, por sua vez, se assemelham em ambas as regiões, sendo mais abundantes no verão e outono. O padrão de abundância encontrado para os filhotes e *Bothrops alternatus* ao longo do ano, foi semelhante ao padrão de *B. jararaca*. Este padrão pode estar relacionado ao período de maior atividade dos filhotes, onde os mesmos estão forrageando a procura de alimento meses após os nascimentos (SALOMÃO et. al, 1995).

3.5 CONCLUSÕES

- Há dimorfismo sexual entre fêmeas e machos de *Bothrops alternatus*, onde as fêmeas atingem maiores tamanhos corporais e os machos maiores tamanhos de caudas;
- Não há diferença significativa de tamanhos corporais e tamanhos caudais entre as populações de fêmeas e machos de *Bothrops alternatus* (Região A – centro-oeste e sudeste e Região B – sul), exceto o comprimento rostro-cloacal dos machos. Na Região B os machos apresentam-se maiores que na Região A.
- Para a Região A, há uma maior abundância de adultos de *Bothrops alternatus* no verão e outono, época de nascimentos, cópula e forrageio.

- Para a Região B, há uma maior abundância de adultos de *Bothrops alternatus* no outono, inverno e primavera. Este padrão de atividade sazonal foi diferenciado da Região A, evidenciando a adaptação desta espécie ao clima frio;
- A atividade sazonal de filhotes, em ambas as regiões, foi maior no verão e outono, época de nascimentos e de forrageio.

REFERÊNCIAS

- ALBOLEA, A. B. P.; SALOMÃO, M. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; JORDÃO, R. S. Epidemiologia de acidentes causados por serpentes não peçonhentas no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 4, n. 5, p. 99-108, 1999.
- ALBOLEA, A. B. P.; SALOMÃO M. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; JORDÃO, R. S. Epidemiologia de acidentes causados por serpentes não peçonhentas no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Universidade Guarulhos**, v. 5, p. 99-108, 2002.
- ALDRIDGE, R. D.; DUVALL, D. Evolution of the mating season in the pitvipers of North America. **Herpetological Monographs**, v.16, p. 1-25, 2002.
- ARAÚJO, D. P. **Biogeografia histórica das jararacas do grupo *Bothrops alternatus* (Serpentes, Viperidae)**. 2015, 54 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, 2015.
- AUBRET, F.; BONNET, X.; SHINE, R., LOURDAIS, O. Fat is sexy for females but not males: the influence of body reserves on reproduction in snakes (*Vipera aspis*). **Hormones and Behavior**, v. 42, p. 135–147, 2002.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 7-16, 2003.
- BONNET, X.; NAULLEAU, G.; SHINE, R.; LOURDAIS, O. What is the appropriate timescale for measuring costs of reproduction in a typical capital breeder: the aspic viper. **Evolutionary Ecology**, v. 13, p. 485-497, 2000.
- CLARK Jr., D. R. Notes on sexual dimorphism in tail-length in American snakes. **Transactions of Kansas Academy of Sciences**, v. 69, p. 226-232, 1966.
- GREENE, H. W.. Systematics and natural history, foundations for understanding and conserving biodiversity. **American Zoology**, v. 34, p. 48-56, 1994.

GREENE, H. W.; LOSOS J. B. Systematics, natural history and conservation. **BioScience**, v. 38, p. 458-452, 1988.

HILLIS, D. M. American molecular naturalist (review of Avise, J. C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution, Chapman; Hall, New York). **Ecology**, v. 76, p. 1017-1018, 1995.

HOUSTON, P. A.; STEPHENS, I. L.; BOYD, K. C.; HARDING, J. M.; MCNAMRA, F. Capital or income breeding? A theoretical model of female reproductive strategies. **Behavioral Ecology**, v. 18, n. 1, p. 241-250, 2007.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F.; LEINZ, F. F.; FIGUEIREDO, V. C. F. Sexual dimorphism in adult *Bothrops jararaca*. **Bulletin of Chicago Herpetological Society**, v. 27, p. 94-95, 1992.

KING, R. B. Sexual dimorphism in snake tail: length: sexual selection, natural selection, or morphological constraint? **Biological Journal of Linnean Society**, v. 38, p. 133-154, 1989.

KLAUBER, L. M. Tail-length differences in snakes with notes on sexual dimorphism and the coefficient of divergence. **Bulletin of Zoological Society of San Diego**, v. 18, p.1-60, 1943.

LILLYWHYTE, H. B. Temperature, energetic and physiological ecology. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S. **Snakes: Ecology and Evolucionary Biology**. New York - MacMillan. 1987. p. 422-477.

MARQUES, O. A. V.; ETEROVIC, A.; ENDO, W. Seasonal activity of snakes in the Atlantic Forest in southeastern Brazil. **Anphibia-Reptilia**, v.22 , p. 103-111, 2001.

MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G. W.; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. **Biology of the Vipers**. Utah: Eagle Mountain Publishing; 2002. p. 307-328.

MESQUITA, D. O., BRITES, V. L. C. Aspectos Taxonômicos e Ecológicos de uma População de *Bothrops alternatus* Duméril, Briçon & Duméril, 1854 (Serpentes,

Viperidae) das Regiões do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Biologia Geral e experimental**, v. 3, n. 2, p. 33-38, 2003.

NUNES, S. F.; KAEFER, I. L.; LEITE, P. T.; CECHIN, S. Z. Reproductive and feeding biology of the pitviper *Rhinocerophis alternatus* from subtropical Brazil. **Herpetological Journal**, v. 20, p. 31-39, 2010.

PLUMMER, M. V. Annual Variation in Stored Lipids and Reproduction in Green Snakes (*Opheodrysa estivus*). **Copeia**, v. 3, p. 741-745, 1983

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Acidente por Serpentes do gênero *Bothrops*: Série de 3.139 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 475-480, 1997.

ROJAS, C. A.; GONÇALVES, M. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Epidemiologia dos acidentes ofídicos na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 3, p. 193-204, 2007.

SALOMÃO, M. G.; ALBOLEA, A. B. P.; SOBREIRO-GONÇALVES, E.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Animais peçonhentos no município de Guarulhos, São Paulo, Brasil: incidência de acidentes e circunstâncias com vistas a sua prevenção. **Publicações Avulsas do Instituto Pau Brasil**, v. 8-9, p. 77-83, 2005.

SALOMÃO, M. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; PUORTO, G. Activity pattern of the rattlesnake *Crotalus durissus* (Viperidae: Crotalinae): Feeding, reproduction and snakebite. **Studies on Neotropical Fauna Environment**, v. 30, p. 101-106, 1995.

SAZIMA I. Um estudo de biologia comportamental de jararaca, *Bothrops jararaca*, com uso de marcas naturais. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 50, p. 83-99, 1988.

SEIGEL, R.A.; FITCH, H.S. Ecological patterns of relative clutch mass in snakes. **Oecologia**, v. 61, p. 293-301, 1984.

SEMLITSCH, R. D., GIBBONS, J. W. Body size dimorphism and sexual selection in two species of water snakes. **Copeia**, v.1982, n. 4, p. 974-976, 1982.

SHINE, R. Sexual dimorphism in snakes revised. **Copeia**, v. 1994, p.326- 346, 1994.

SHINE, R. Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence. **The quarterly review of biology**, v. 64, n. 4, p. 419-461, 1989.

SHINE, R. Sexual size dimorphism and male combat in snakes. **Oecologia**, v. 33, p. 269-277, 1978.

SILVA, K. M. P. **Biologia reprodutiva da jararaca da Amazônia, *Bothrops atrox* (Serpente: Viperidae)** – 2015. 81 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SOLÓRZANO, A.; CERDAS, L. Reproductive biology and distribution of the terciopelo, *Bothrops asper* Garman (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. **Herpetologica**, v. 45, p. 444–450, 1989.

VALDUJO, P. H.; NOGUEIRA, C.; BRANDÃO, R. A. Ecologia de viperídeos do cerrado: *Bothrops itapetiningae* (Boulenger 1907) (Serpentes: Viperidae). **Publicação Extra do Museo Nacional de História Natural Montevideo**, v. 35, p. 50-116, 1999.

ZAR, J. R. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. p. 875.

ZUG, G. R.; VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology an introductory biology of amphibians and reptiles**. 2ed. San Diego, Academic Press. 2001, 630p.

APÊNDICE

APÊNDICE A: Identificação dos espécimes de *Bothrops alternatus* analisados:

FUNED – Fundação Ezequiel Dias - 0019, 0020, 0026, 0029, 0701, 0979, 1400, 1429, 1644, 1761, 1839, 1841, 1956, 2390, 2392, 2399, 2401, 2417, 2446, 2453, 2454, 2516, 2519, 2523, 2534, 2558, 2584, 2605, 2700, 2782, 2783, 2784, 2802, 2811, 2812, 2828, 2829, 2830, 2831 .

PUC-MG – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais – 005, 3520.

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto - 343 S, 360 S, 416 S, 485 S, 487 S, 535 S, 537 S, 538 S, 539 S, 568 S, 572 S, 573 S, 574 S, 642 S, 664 S, 677 S, 712 S .

Coleção Herpetológica de Alfenas- 196, 491, 474, 522 ,519, 258, 513, 257, 008, 445, 321, 455, 465.

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais – 733, 731, 739.

MNRJ – Museu Nacional do Rio de Janeiro – 10.002, 14.207, 24.375, 21.672, 22.094, 8.602, 8.337.

IVB - Instituto Vital Brazil – 326, 372, 2764, 1476, 2547, 1160, 1516 .

IB – Instituto Butantan – 60013, 54962, 78872, 78000, 74042, 72735, 8623, 18970, 73575, 84797, 84796, 8950, 21660, 63506, 17962.

UNB – Universidade de Brasília – 19256, 19257, 19258, 19260, 19261, 19262, 19263, 19264, 19265, 19266, 19271.

UPF – Universidade de Passo Fundo – 247, 264, 346, 418, 840, 995, 1036, 1068, 1299, 1338, 1349, 1372, 1375, 1437, 1461, 1467, 1468, 1470, 1471,

1485, 1486, 1487, 1586, 1603, 1184, 826, 1026, 1034, 1046, 1253, 1401, 1489, 1704, 1717.

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria – 217, 273, 274, 278, 304, 387, 592, 611, 667, 763, 836, 950, 1132, 1373, 1378, 1387, 1616, 1637, 1975, 1986, 2397, 2398, 2424, 2449, 2598, 2625.

MCN – Museu de ciências Naturais de Porto Alegre – 7170, 10041, 10204, 10228, 10392, 10886, 10950, 10982, 11059, 11394, 12492, 12497, 12583, 12741, 12745, 12812, 14117, 15105, 15424, 15711, 16675.

4 CONCLUSÕES GERAIS

Os ciclos reprodutivos de *Bothrops alternatus*, de um modo geral, não diferiu entre as populações das Regiões A e B (região de clima tropical e região de clima temperado, respectivamente). Portanto, esta é uma espécie que apresenta um ciclo reprodutivo conservado. As fêmeas apresentaram as mesmas épocas de parturição, estocagem de espermatozoides, gestação e ovulação. O período de acasalamento também foi semelhante para ambas as regiões. Para os machos, o ciclo também apresentou-se sazonal, contudo, houve uma diferença no tempo de espermiogênese, e na hipertrofia do segmento sexual renal. Sendo a espermiogênese dos machos da região A um pouco mais prolongada, tendo o seu final apenas no início do inverno e não no final do outono como na Região B. E a hipertrofia do segmento sexual renal sendo mais extenso na região B, finalizando no início da primavera e não no final do inverno como ocorre na Região A.

Fêmeas reprodutivas apresentaram-se em maior proporção na Região B, fato que pôde ser explicado pela adaptação desta espécie em regiões de climas mais frios, devido a a origem da dispersão do seu ancestral em locais de climas mais frios, demonstrando a influência da temperatura nos ciclos reprodutivos. Este fato, também pôde ser corroborado com o padrão de atividade sazonal das serpentes *Bothrops alternatus* adultas do sul do Brasil (Região B), que apresentaram maior atividade no outono, inverno e primavera, diferentemente das serpentes da Região A, que foram mais abundantes no verão e no outono. Esta espécie também apresenta um dimorfismo sexual, sendo as fêmeas maiores que os machos e os machos apresentando o tamanho da cauda maior.

REFERÊNCIAS GERAIS

- BARROS, V. A.; SUEIRO, L. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of phylogenetic conservatism of reproductive patterns. **Herpetological Journal**, v. 22, p. 97-104, 2012.
- BLACKBURN, D. G. Squamate reptiles as model organisms for the evolution of viviparity. **Herpetological Monographs**, v. 20, p. 131-146, 2006.
- BLACKBURN, D. G.; STEWART, J. R. Viviparity and Placentation in Snakes. In: Aldridge, R. D.; Sever, D. M. (Ed.). **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. New Hampshire: Science Publishers, Enfield, 2011. p. 119-181.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous**: Reptiles of Latin America. Ithaca: Cornell University Press; 1989. p. 365-367.
- CARRASCO, P.A.; MATTONI, C.I.; LEYNAUD, G.C.; SCROCCHI, G.J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**. v. 41, p. 109-124, 2012.
- FITCH, H. Reproductive cycles in tropical reptiles. **Occasional Papers of the Museum of Natural History University of Kansas**, n. 96, p. 1-53, 1982.
- MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: Schuett, G. W.; Hoggren, M.; Douglas, M. E.; Greene, H. W. (Ed.). **Biology of the Vipers**. Utah, Eagle Mountain Publishing; 2002. p. 307-328.
- MESQUITA, D. O.; BRITES, V. L. C. Aspectos Taxonômicos e Ecológicos de uma População de *Bothrops alternatus* Duméril, Bribon & Duméril, 1854 (Serpentes, Viperidae) das Regiões do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Biologia Geral e experimental**, v. 3, n. 2, p. 33-38, 2003.
- NUNES, S. F. **Dieta e Biologia reprodutiva da Cruzeiro, Bothrops alternatus (serpentes-viperidae), na região sul do Brasil**. 2006. 68 p. Dissertação (Mestrado

em Ciências Biológicas) Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2006.

NUNES, S. F.; KAEFER, I. L.; LEITE, P. T.; CECHIN, S. Z. Reproductive and feeding biology of the pitviper *Rhinocerophis alternatus* from subtropical Brazil.

Herpetological Journal, v. 20, p. 31-39, 2010.

PARKINSON, C. L.; CAMPBELL, J. A.; CHIPPIINDALE, P. T. Multigene phylogenetic analysis of pitvipers, with comments on their biogeography. In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. **Biology of the Vipers**. Eagle Mountain, UT: Eagle Mountain Publishing, p. 93– 110, 2002.

SALOMÃO, M. G., WÜSTER, W., THORPE, R. S.; BBBSP. DNA evolution of South American pitvipers of the genus *Bothrops*. In: THORPE, R. S.; WÜSTER, W.; MALHOTRA, A.. **Venomous Snakes: Ecology, Evolution, and Snakebite**. Oxford: Clarendon Press, 1997, p. 89–98.

SALOMÃO, M. G.; WÜSTER, W.; THORPE, R. S.; BBBSP. MtDNA phylogeny of Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops* (Squamata: Serpentes: Viperidae).

Kaupia, v. 8, p. 127–134, 1999.

SEIGEL, R. A.; FORD, N. B. Reproductive ecology. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S.. **Snakes: Ecology and evolutionary Biology**. Nova York: MacMillan Publ. Co.; 1987. p.210-252.

SHINE, R. The evolution of viviparity in reptiles: An ecological analysis. In: GAINS, C.; BILLETT, F. **Biology of the reptilian**. New York: John Wiley, 1985, v. 15, p. 606-694.

WÜSTER, W.; SALOMÃO, M. G.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A.; THORPE, R. S.; BBBSP. Origins and evolution of the South American pit viper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. **Biology of the Vipers**. Utah: Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain, 2002. p. 111–128,