LÍVIA CRISTINA DOS SANTOS

**Biologia reprodutiva comparada de Amphisbaenidae (Squamata,
Amphisbaenia) do Brasil**

São Paulo

2013

LÍVIA CRISTINA DOS SANTOS

**Biologia reprodutiva comparada de Amphisbaenidae (Squamata,
Amphisbaenia) do Brasil**

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

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:
Prof^ª. Dr^ª. Selma Maria Almeida Santos

São Paulo

2013

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.2759 FMVZ	<p>Santos, Lívia Cristina dos Biologia reprodutiva comparada de Amphisbaenidae (Squamata, Amphisbaenia) do Brasil / Lívia Cristina dos Santos. -- 2013. 260 f. : il.</p> <p>Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2013.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.</p> <p>Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.</p> <p>Orientador: Profa. Dra. Selma Maria Almeida Santos.</p> <p>1. Ciclo reprodutivo. 2. Amphisbaenidae. 3. Amphisbaenia. 4. dimorfismo sexual. 5. fecundidade. I. Título.</p>
----------------	---

*Comissão de Ética no uso de animais***CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto intitulado “Biologia reprodutiva comparada de *Amphisabenidae* (Squamata, *Amphisbaenia*) do Brasil.”, protocolado sob o nº 2842/2012, utilizando 11 espécies de *Amphisbaenia* brasileiras e 2 da Europa e Norte da África (coleções zoológicas do Brasil e do Exterior), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Selma Maria Almeida Santos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 28/11/2012.

We certify that the Research “Comparative reproductive biology of *Amphisabenidae* (Squamata, *Amphisbaenia*) from Brazil”, protocol number 2842/2012, under the responsibility Profa. Dra. Selma Maria Almeida Santos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/28/2012.

São Paulo, 29 de novembro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SANTOS, Livia Cristina dos

Título: Biologia reprodutiva comparada de Amphisbaenidae (Squamata, Amphisbaenia) do Brasil

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Às minhas avós, Priscilla (em memória) e Maria Sara.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Selma Maria Almeida Santos, pela paciência, dedicação, pela confiança no meu trabalho e pelos anos de amizade. Obrigada pela alegria e bom humor de todos os dias, que tornaram o caminho mais leve e agradável. Agradeço também por ter me incentivado desde o início no estudo das tão encantadoras quanto enigmáticas anfisbenas.

Ao Ivan Ineich, por ter me orientado durante meu estágio no Muséum National d'Histoire Naturelle, e por ter me recebido com tanta disposição e simpatia. Obrigada por estar sempre pronto a ajudar, a discutir os dados, e sempre de bom humor, o que me ajudou a aproveitar ao máximo minha estadia no MNHN.

À Tamí Mott, co-orientadora e amiga, por sempre me apoiar e pela companhia no estudo das anfisbenas. Obrigada também pelas valiosas sugestões e discussões dos dados, e pela grande ajuda com os mapas!

Aos pesquisadores do Laboratório de Ecologia e Evolução, Otavio A. V. Marques, Nancy Oguiura, Maria José Silva e Herbert Ferrarezzi.

Aos colegas e amigos do LEEV, Natália, Adriana, Kelly, Patrícia, Cristian, Taís, Poliana, D. Maria e D. Vera pela companhia e apoio. Agradeço especialmente à Thaís Guedes, pela inestimável ajuda para começar a desbravar o Arc-GIS.

Aos amigos do Grupo de Estudos em Reprodução de Squamata, Letícia Ruiz Sueiro, Verônica Barros, Karina Kasperoviczus, Viviane Garcia, Maria Adelaida Hoyos Argaez, Kalena Barros, Karina Maria Pereira da Silva, Patrícia Marinho, Serena Migliore, Evandro Galvão, Claudio Rojas, Henrique Braz, Diego Muniz e Igor Federsoni. As discussões com vocês foram valiosas!

À Marta Antoniazzi, Carlos Jared, Simone Jared, Leonardo Oliveira e colegas do laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, por estarem sempre dispostos a ajudar.

À professora Adriana Alves, do Instituto de Geociências da USP, pela grande ajuda com o uso do Arc-GIS.

Aos curadores das coleções visitadas durante este estudo, pela atenção e cooperatividade, e por permitir o exame de espécimes, que foram fundamentais para que esse trabalho pudesse ser realizado: Glaucia Funk Pontes, Ana Prudente, Soumia Fahd, Francisco Luís Franco, Paulo Passos, Ronaldo Fernandes, Guarino Colli, Marcos Carvalho, Júlio Leite, Paulo Manzani, Jesús Benzal, Michel Dominguez, José Fernández e Ivan Ineich. À Marcela Ayub Brasil e Pedro Pinna, gerentes de coleção da Universidade de Brasília e do Museu Nacional.

Ao Valdir José Germano, pela sempre valiosa assistência na coleção do Butantan.

À Heloísa Lopes, pelas excelentes aulas de Francês, que foram de fundamental importância para minha estadia na França. Obrigada também pela amizade, pelo apoio, e pela sempre agradável companhia.

Ao professor Vivian DeBuffrénil, por disponibilizar a estrutura de seu laboratório, e pelas valiosas sugestões de análises.

Je me permets ici de faire un petit paragraphe em Français pour remercier tous mes collègues du Laboratoire de Reptiles et Amphibiens du Muséum National d'Histoire Naturelle, pour m'avoir si bien accueilli et pour être si gentils et sympas. Je vous remercie de tout coeur, Victoire, Laure, Marc, Élise, Myrienne, Didier, Yves, Sandra, Stéphan, Jérôme, Mohamed. Je remercie surtout aux professeurs Ivan Ineich, Jean Lescure, Annemarie Ohler, Roger Bour et Alain Dubois.

À FAPESP e à CAPES, pelo apoio financeiro.

Agradeço aos meus pais, por todo o apoio e incentivo, por todo o amor que me dedicaram. E por terem me ajudado a lidar com a saudade durante meus meses na França. Seu apoio foi fundamental, em todos os momentos. Ao meu irmão Fábio, pelo apoio e por estar sempre disposto a ajudar.

Aos meus tios, tias, primos e primas por torcerem sempre por mim, em especial ao meu padrinho Péricles Ronei dos Santos e à minha madrinha Maria de Fátima Rosa. Ao primo Vinícius Zanin, pela valiosa assistência em questões de informática.

Ao meu tio Paulo Roberto dos Santos, exemplo de amor ao trabalho acadêmico, pelo grande incentivo desde meu ingresso na USP, e durante todo o mestrado e doutorado.

Às minhas queridas avós, Maria Sara e Priscilla, por todo o amor, carinho e incentivo. Em especial à vó Cila, que tanto me apoiou nos estudos, no trabalho com as "cobrinhas", mas que não pôde esperar meu retorno da França... Saudades...

Ao Lessandro, por todo o amor, dedicação, incentivo e infinita paciência. Por me fazer companhia madrugada adentro enquanto eu analisava lâminas no Butantan, por aguentar os inevitáveis momentos de estresse, por ter me acompanhado na França. Por tudo o que não dá pra escrever!

A todos que colaboraram para que este trabalho se fizesse possível.

RESUMO

SANTOS, L. C. **Biologia reprodutiva comparada de Amphisbaenidae (Squamata, Amphisbaenia) do Brasil.** [Comparative reproductive biology of Amphisbaenidae (Squamata, Amphisbaenia) from Brazil]. 2013. 260f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A biologia reprodutiva dos Amphisbaenia é uma das menos estudadas entre os répteis, havendo na literatura informações sobre o ciclo reprodutivo, dimorfismo sexual e fecundidade de poucas espécies do grupo, além de informações pontuais acerca de oviposturas. A histologia das vias genitais, da mesma forma, foi pouco estudada, tornando difícil uma melhor caracterização dos ciclos de machos e fêmeas. No Brasil são encontradas cerca de um terço das espécies do grupo, distribuídas por regiões com diferentes características macroclimáticas. Este trabalho teve por objetivo caracterizar o ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de onze espécies brasileiras da família Amphisbaenidae, com base em dados de dissecação e histologia, e analisá-los comparativamente tendo como referência a filogenia molecular já proposta para as Amphisbaenidae do Brasil. Objetivou-se ainda realizar uma análise preliminar da relação entre os ciclos reprodutivos observados e variações sazonais de temperatura e precipitação. Para tanto, foram analisados espécimes depositados em coleções zoológicas, que tiveram suas gônadas e órgãos urogenitais examinados e medidos. Foram ainda realizadas análises histológicas de ovidutos, testículos, ductos deferentes e rins de espécimes coletados em diferentes meses do ano, para análise de sua morfologia e caracterização dos ciclos espermatogênico, de estocagem de esperma e de atividade do segmento sexual renal. Foram ainda analisados espécimes e lâminas histológicas de duas espécies da família Blanidae e uma da família Trogonophidae, permitindo uma melhor discussão das características observadas tendo como referência a filogenia do grupo. Foram analisados também dados de dimorfismo sexual de tamanho do corpo e de fecundidade. Os machos de quatro espécies de Amphisbaenidae amostradas apresentaram ciclos reprodutivos assazonais, com períodos de repouso não sincrônicos entre os indivíduos. Os machos de outras sete espécies de Amphisbaenia, duas de Blanidae e uma de Trogonophidae apresentaram ciclos sazonais. Todas as sete espécies para as quais o ciclo das fêmeas pôde ser caracterizado são sazonais nesse aspecto. Os ciclos de machos foram comparados quanto à época e duração das fases de espermatogênese, estocagem de esperma e atividade secretora do segmento sexual renal, tendo sido obtidas evidências de relação entre essas características e a filogenia do grupo. As fases reprodutivas das espécies de Amphisbaenia brasileiras são mais extensas em comparação com aquelas observadas em Blanidae e Trogonophidae. Também se obtiveram evidências preliminares da relação entre sazonalidade dos ciclos reprodutivos e variações anuais de temperatura e precipitação. Em sete espécies de Amphisbaenidae, foi observado dimorfismo sexual quanto ao comprimento rostro-cloacal ou ao comprimento da cauda. A fecundidade das fêmeas varia entre um e quatro ovos, na maioria das espécies analisadas, mas pode chegar a sete em *Amphisbaena mertensi* e nove em *Amphisbaena trachura*.

Palavras-chave: Ciclo reprodutivo. Amphisbaenidae. Amphisbaenia. Dimorfismo sexual. Fecundidade.

ABSTRACT

SANTOS, L. C. **Comparative reproductive biology of Amphisbaenidae (Squamata, Amphisbaenia) from Brazil.** [Biologia reprodutiva comparada de Amphisbaenidae (Squamata, Amphisbaenia) do Brasil]. 2013. 260f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The reproductive biology of the Amphisbaenia is one of the less known among reptiles. In the literature, there are information on the reproductive cycle, sexual dimorphism, and clutch size for few species, and scarce data on clutches of eggs. Similarly, the histology of the genital tract was studied in few species, which makes difficult to characterize properly the reproductive cycles of males and females. Almost one third of the species of the group occur in Brazil, in regions with different climates. This study aimed to characterize the reproductive cycle of males and females of eleven Brazilian species of the family Amphisbaenidae, based on the dissection and histological analysis of gonads and genital ducts, and to compare the obtained data with regard to the molecular phylogeny already proposed for the Brazilian species of this family. It also aimed to analyze preliminarily the relation between the observed reproductive cycles and seasonal variations of temperature and precipitation. Specimens from zoological collections were analyzed to examination and measuring of the gonads and urogenital organs. Samples of the oviducts, testis, ductus deferens and kidneys from specimens collected in various months were also analyzed using light microscopy to characterize the cycles of spermatogenesis, sperm storage, and activity of the sexual segment of the kidney. Specimens and histology slides of two Blanidae species and one Trogonophidae species were also analyzed, allowing a better discussion of the characteristics of the reproductive cycles referring to the phylogeny of the group. Sexual size dimorphism and clutch size were also analyzed. The males of four Amphisbaenidae species presented aseasonal reproductive cycles, with testicular recrudescence and rest phases not synchronized among individuals. The males of the other seven Amphisbaenidae species, two Blanidae species and one Trogonophidae species presented seasonal reproductive cycles. The seven species for which the reproductive cycles of females could be characterized are seasonal in this regard. The male reproductive cycles were compared considering seasonality and the length of spermatogenesis, sperm storage and secretory activity of the sex segment of the kidney. Evidence of relation between the reproductive cycle characteristics and the phylogeny of the family Amphisbaenidae was obtained. The reproductive seasons of Brazilian Amphisbaenia are longer than those observed in Blanidae e Trogonophidae. Preliminary evidence on the relation between reproductive cycle seasonality and annual variations of temperature were also obtained. Seven Amphisbaenidae species presented sexual dimorphism in snout-vent length or caudal length. Clutch size varies from one to four eggs in most species, but reaches seven eggs in *Amphisbaena mertensi* and nine in *Amphisbaena trachura*.

Keywords: Reproductive cycle. Amphisbaenidae. Amphisbaenia. Sexual dimorphism. Clutch size.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	- Análise de variância
ANCOVA	- Análise de covariância
CC	- comprimento caudal
CHUNB	- Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília
CRC	- comprimento rostro-cloacal
CRIB	- Coleção Referência do Instituto Butantan
DC	- diâmetro do corpo
dd	- ducto deferente
EEZA	- Estación Experimental de Zonas Áridas (Almería, Espanha)
ept	- epitélio
K-W	- teste de Kruskal-Wallis
gl	- glândula oviducal
lp	- lâmina própria
MCP	- Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
MHNCI	- Museu de História Natural do Capão da Imbuia
mm	- milímetros
MNCN	- Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid
MNHN	- Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris
MNRJ	- Museu Nacional, Rio de Janeiro
MPEG	- Museu Paraense Emílio Goeldi
SSR	- segmento sexual renal
UFMT	- Universidade Federal de Mato Grosso

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localidades de coleta dos espécimes adultos de <i>Amphisbaena alba</i> amostrados, mostrando sua distribuição nos biomas e ecorregiões brasileiros.....	51
Figura 2 – Comprimento do maior folículo ou ovo observado em cada fêmea adulta de <i>Amphisbaena alba</i> de localidades de Cerrado, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	52
Figura 3 – Comprimento do maior folículo ou ovo observado em cada fêmea adulta de <i>Amphisbaena alba</i> de localidades da região de Mata Atlântica, segundo as datas de coleta das mesmas.....	53
Figura 4 – Comprimento do maior folículo ou ovo observado em cada fêmea adulta de <i>Amphisbaena alba</i> , segundo as datas de coleta das mesmas, considerando a totalidade da amostra.....	54
Figura 5 – Cortes histológicos de ovidutos de <i>Amphisbaena alba</i>	55
Figura 6 – Gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear entre os dados de volume testicular e comprimento rostro-cloacal em <i>Amphisbaena alba</i> adultos, das regiões de Cerrado e Matas Secas de Chiquitano.....	58
Figura 7 – Gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear entre os dados de volume testicular e comprimento rostro-cloacal em <i>Amphisbaena alba</i> adultos, considerando a amostra completa.....	59
Figura 8 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular da amostra completa de machos adultos de <i>Amphisbaena alba</i> , organizados em quatro estações do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	59
Figura 9 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular da amostra completa de machos adultos de <i>Amphisbaena alba</i> , separados entre estações seca e chuvosa, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	60
Figura 10 – Gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear entre comprimento rostro-cloacal e diâmetro do ducto deferente de <i>Amphisbaena alba</i> , de espécimes coletados em regiões de Cerrado e Matas Secas de Chiquitano.....	61
Figura 11 – Gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear entre comprimento rostro-cloacal e diâmetro do ducto deferente de <i>Amphisbaena alba</i> , na totalidade de espécimes adultos amostrados.....	61
Figura 12 – Diagrama boxplot dos dados de diâmetro do ducto deferente distal da amostra completa de adultos de <i>Amphisbaena alba</i> , separados entre as estações seca e chuvosa, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	62

Figura 13 – Gráfico de dispersão dos resíduos resultantes da análise de regressão linear entre comprimento do rim e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de <i>Amphisbena alba</i> das ecorregiões de Cerrado e Matas de Chiquitano.....	63
Figura 14 – Gráficos de dispersão dos resíduos resultantes da análise de regressão linear entre comprimento do rim e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de <i>Amphisbaena alba</i> (amostra completa).....	63
Figura 15 – Diagramas boxplot dos dados de comprimento do rim direito, da amostra completa de machos adultos de <i>Amphisbaena alba</i> , separados entre as estações seca e chuvosa.....	64
Figura 16 – Diagramas boxplot dos dados de diâmetro do rim de <i>Amphisbaena alba</i> machos, divididos segundo a estação do ano em que os espécimes foram coletados, considerando-se quatro estações do ano.....	65
Figura 17 – Diagramas boxplot dos dados de diâmetro do rim de <i>Amphisbaena alba</i> machos, divididos segundo a estação do ano em que os espécimes foram coletados, considerando-se duas estações do ano.....	65
Figura 18 – Gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear entre comprimento rostro-cloacal e diâmetro do rim de <i>Amphisbaena alba</i> machos.....	66
Figura 19 – Cortes histológicos de machos adultos de <i>Amphisbaena alba</i>	68
Figura 20 – Distribuição das localidades de coleta dos espécimes de <i>Amphisbaena anomala</i> adultos amostrados, nos biomas e ecorregiões brasileiros.....	71
Figura 21 – Gráfico de dispersão dos valores de comprimento do maior folículo medido em cada fêmea adulta de <i>Amphisbaena anomala</i>	72
Figura 22 – Cortes histológicos do oviduto de <i>Amphisbaena anomala</i>	73
Figura 23 – Gráfico de dispersão dos valores de soma dos volumes dos testículos direito e esquerdo de <i>Amphisbaena anomala</i> adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	75
Figura 24 – Diagrama boxplot dos valores de soma dos volumes dos testículos direito e esquerdo de <i>Amphisbaena anomala</i> adultos, agrupados em estações do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	75
Figura 25 – Gráfico de dispersão dos valores de diâmetro do ducto deferente distal de <i>Amphisbaena anomala</i> adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	76
Figura 26 – Diagrama boxplot dos dados de diâmetro do ducto deferente de <i>Amphisbaena anomala</i> separados por estações do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	77

Figura 27 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre comprimento do rim e comprimento rostro-cloacal de <i>Amphisbaena anomala</i> adultos.....	78
Figura 28 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do rim e comprimento rostro-cloacal de <i>Amphisbaena anomala</i> adultos.....	78
Figura 29 – Diagrama boxplot dos dados de comprimento dos rins de <i>Amphisbaena anomala</i> , separados por estação do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	79
Figura 30 – Diagrama boxplot dos dados de diâmetro dos rins de <i>Amphisbaena anomala</i> , separados por estação do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	79
Figura 31 – Cortes histológicos de machos de <i>Amphisbaena anomala</i>	82
Figura 32 – Distribuição das localidades de coleta dos espécimes de <i>Amphisbaena dubia</i> adultos amostrados, nos biomas e ecorregiões brasileiros (à esquerda e à direita, respectivamente).....	84
Figura 33 – Gráfico de dispersão dos valores de comprimento do maior folículo ou ovo medido em cada fêmea adulta de <i>Amphisbaena dubia</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	85
Figura 34 – Cortes histológicos de ovidutos de <i>Amphisbaena dubia</i>	86
Figura 35 – Gráfico de dispersão dos valores de volume testicular de <i>Amphisbaena dubia</i> adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	89
Figura 36 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular de <i>Amphisbaena dubia</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes, organizados segundo as estações do ano.....	90
Figura 37 – Gráfico de dispersão dos dados de diâmetro dos ductos deferentes de <i>Amphisbaena dubia</i> adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	91
Figura 38 – Diagrama boxplot dos dados de diâmetro dos ductos deferentes de <i>Amphisbaena dubia</i> adultos, organizados em estações do ano, segunda as datas de coleta dos espécimes.....	91
Figura 39 – Gráfico de dispersão dos dados de comprimento dos rins de <i>Amphisbaena dubia</i> adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	92
Figura 40 – Gráfico de dispersão dos dados de diâmetro dos rins de <i>Amphisbaena dubia</i> adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	92
Figura 41 – Cortes histológicos de machos de <i>Amphisbaena dubia</i>	94
Figura 42 – Distribuição das localidades de coleta dos espécimes de <i>Amphisbaena infraorbitale</i> adultos amostrados, nos biomas e ecorregiões brasileiros.....	96

Figura 43 – Gráfico de dispersão dos valores de comprimento do maior folículo ou ovo medido em cada fêmea adulta de <i>Amphisbaena infraorbitale</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	98
Figura 44 – Cortes histológicos de ovidutos de <i>Amphisbaena infraorbitale</i>	100
Figura 45 – Gráfico de dispersão dos valores de volumes testiculares de machos adultos de <i>Amphisbaena infraorbitale</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	102
Figura 46 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular de <i>Amphisbaena infraorbitale</i> adultos, divididos por estações do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	103
Figura 47 – Gráfico de dispersão dos valores de volumes testiculares de machos adultos de <i>Amphisbaena infraorbitale</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	104
Figura 48 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre comprimento do rim e comprimento rostro-cloacal, em <i>Amphisbaena infraorbitale</i> machos adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	104
Figura 49 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do rim e comprimento rostro-cloacal, em <i>Amphisbaena infraorbitale</i> machos adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	105
Figura 50 – Cortes histológicos de machos adultos de <i>Amphisbaena infraorbitale</i>	106
Figura 51 – Localidades de coleta dos espécimes de <i>Amphisbaena kingi</i> adultos amostrados, e sua distribuição nos biomas e ecorregiões brasileiros.....	108
Figura 52 – Gráfico de dispersão dos comprimentos do maior folículo ou ovo medido em cada fêmea adulta de <i>Amphisbaena kingi</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	109
Figura 53 – Corte histológico de fêmea de <i>Amphisbaena kingi</i> em vitelogênese secundária, mostrando glândulas no endométrio.....	110
Figura 54 – Gráfico de dispersão dos dados de volume testicular de machos adultos de <i>Amphisbaena kingi</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	112
Figura 55 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular de <i>Amphisbaena kingi</i> adultos, organizados por estações do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	112
Figura 56 – Cortes histológicos de machos adultos de <i>Amphisbaena kingi</i>	114
Figura 57 – Gráfico de dispersão dos dados de diâmetro dos ductos deferentes de machos adultos de <i>Amphisbaena kingi</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	115

Figura 58 – Diagrama boxplot dos dados diâmetro dos ductos deferentes de <i>Amphisbaena kingi</i> adultos, organizados por estações do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	116
Figura 59 – Gráfico de dispersão dos dados de diâmetro dos rins de machos adultos de <i>Amphisbaena kingi</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	117
Figura 60 – Gráfico de dispersão dos dados de comprimento dos rins de machos adultos de <i>Amphisbaena kingi</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	117
Figura 61 – Localidades de coleta dos espécimes de <i>Amphisbaena mertensi</i> adultos amostrados, e sua distribuição nos biomas e ecorregiões brasileiros.....	120
Figura 62 – Gráfico de dispersão das medidas de comprimento do maior folículo ou ovo medido em cada fêmea adulta de <i>Amphisbaena mertensi</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	121
Figura 63 – Cortes histológicos de oviduto de <i>Amphisbaena mertensi</i> adultas.....	123
Figura 64 – Gráficos de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal de <i>Amphisbaena mertensi</i> adultos, segundo as datas de coletas dos espécimes, considerando-se a amostra de Mata Atlântica.....	126
Figura 65 – Gráficos de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal de <i>Amphisbaena mertensi</i> adultos, segundo as datas de coletas dos espécimes, considerando-se a amostra completa, com dados de Mata Atlântica e Cerrado.....	126
Figura 66 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular de <i>Amphisbaena mertensi</i> adultos, separados por estações do ano, de acordo com a data de coleta dos espécimes.....	127
Figura 67 – Cortes histológicos de machos adultos de <i>Amphisbaena mertensi</i> , de localidades do bioma de Mata Atlântica.....	129
Figura 68 – Gráficos de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do ducto deferente e comprimento rostro-cloacal de machos de <i>Amphisbaena mertensi</i> adultos, segundo as datas de coletas dos espécimes, considerando-se a amostra de Mata Atlântica.....	130
Figura 69 – Gráficos de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do ducto deferente e comprimento rostro-cloacal de machos de <i>Amphisbaena mertensi</i> adultos, segundo as datas de coletas dos espécimes, considerando-se a amostra completa, incluindo espécimes de Mata Atlântica e Cerrado.....	130

Figura 70 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre comprimento do rim e comprimento rostro-cloacal de machos de <i>Amphisbaena mertensi</i> adultos, segundo as datas de coletas dos espécimes, considerando-se a amostra de Mata Atlântica.....	131
Figura 71 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do rim e comprimento rostro-cloacal de machos de <i>Amphisbaena mertensi</i> adultos, segundo as datas de coletas dos espécimes, considerando-se a amostra de Mata Atlântica.....	132
Figura 72 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do rim e comprimento rostro-cloacal de machos de <i>Amphisbaena mertensi</i> adultos, segundo as datas de coletas dos espécimes, considerando-se a amostra completa (Mata Atlântica e Cerrado).....	132
Figura 73 – Localidades de coleta dos espécimes de <i>Amphisbaena microcephala</i> adultos amostrados, e sua distribuição nos biomas e ecorregiões brasileiros.....	134
Figura 74 – Gráfico de dispersão dos valores de comprimento do maior folículo ou ovo medido em cada <i>Amphisbaena microcephala</i> adulta amostrada, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	135
Figura 75 – Cortes histológicos ovidutos de fêmeas adultas de <i>Amphisbaena microcephala</i>	137
Figura 76 – Gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal, dos espécimes machos adultos de <i>Amphisbaena microcephala</i> (amostra completa).....	139
Figura 77 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular de <i>Amphisbaena microcephala</i> adultos, separados por estação do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes (amostra completa).....	139
Figura 78 – Gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal, dos espécimes machos adultos de <i>Amphisbaena microcephala</i> coletados em localidades do estado de São Paulo.....	140
Figura 79 – Gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal, dos espécimes machos adultos de <i>Amphisbaena microcephala</i> coletados no estado do Paraná.....	140
Figura 80 – Cortes histológicos de machos adultos de <i>Amphisbaena microcephala</i>	144
Figura 81 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do ducto deferente e comprimento rostro-cloacal, em machos adultos de <i>Amphisbaena microcephala</i> do estado de São Paulo.....	145
Figura 82 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do ducto deferente e comprimento rostro-cloacal, em machos adultos de <i>Amphisbaena microcephala</i> dos estados de São Paulo e Paraná.....	146

Figura 83 – Diagrama boxplot dos dados de diâmetro do ducto deferente de machos adultos de <i>Amphisbaena microcephala</i> , separados por estações do ano segundo as datas de coleta dos espécimes (amostra completa).....	146
Figura 84 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do ducto deferente e comprimento do rim, em machos adultos de <i>Amphisbaena microcephala</i> do estado de São Paulo.....	147
Figura 85 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do ducto deferente e diâmetro do rim, em machos adultos de <i>Amphisbaena microcephala</i> do estado de São Paulo.....	148
Figura 86 – Localidades de coleta dos espécimes de <i>Amphisbaena munoai</i> adultos amostrados, e sua distribuição nos biomas e ecorregiões brasileiros.....	150
Figura 87 – Gráfico de dispersão dos valores de comprimento do maior folículo ou ovo observado em cada fêmea adulta de <i>Amphisbaena munoai</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	151
Figura 88 – Cortes histológicos de oviduto de <i>Amphisbaena munoai</i> fêmea coletada em novembro, com folículos secundários de até 5,5 mm (MCP 12071).....	152
Figura 89 – Gráfico de dispersão dos valores da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de <i>Amphisbaena munoai</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	154
Figura 90 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular de <i>Amphisbaena munoai</i> adultos, separados por estações do ano, segundo a data de coleta dos espécimes	154
Figura 91 – Cortes histológicos de machos adultos de <i>Amphisbaena munoai</i>	156
Figura 92 – Ductos deferentes enovelados de <i>Amphisbaena munoai</i> macho coletado em outubro (MCP 15634), aumento 1x.....	157
Figura 93 – Gráfico de dispersão dos valores de diâmetro do ducto deferente de machos adultos de <i>Amphisbaena munoai</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	158
Figura 94 – Diagrama boxplot dos dados de diâmetro do ducto deferente de <i>Amphisbaena munoai</i> adultos, separados por estações do ano, segundo a data de coleta dos espécimes.....	158
Figura 95 – Gráfico de dispersão dos valores da regressão linear entre diâmetro do rim e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de <i>Amphisbaena munoai</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	159
Figura 96 – Diagrama boxplot dos dados de diâmetro do rim de <i>Amphisbaena munoai</i> adultos, separados por estações do ano, segundo a data de coleta dos espécimes.....	160

Figura 97 – Gráfico de dispersão dos valores da regressão linear entre comprimento do rim e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de <i>Amphisbaena munoai</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	160
Figura 98 – Localidades de coleta dos espécimes de <i>Amphisbaena munoai</i> adultos amostrados, e sua distribuição nos biomas e ecorregiões brasileiros (à esquerda e à direita, respectivamente).....	163
Figura 99 – Gráfico de dispersão dos dados de comprimento do maior folículo observado em cada fêmea adulta de <i>Amphisbaena roberti</i> amostrada nos estados de São Paulo e Goiás.....	164
Figura 100 – Gráfico de dispersão dos valores de volume testicular de machos adultos de <i>Amphisbaena roberti</i> do estado de São Paulo, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	165
Figura 101 – Gráfico de dispersão das medidas de diâmetro do ducto deferente de machos adultos de <i>Amphisbaena roberti</i> do estado de São Paulo, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	166
Figura 102 – Gráfico de dispersão das medidas de comprimento do rim de machos adultos de <i>Amphisbaena roberti</i> do estado de São Paulo, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	166
Figura 103 – Gráfico de dispersão dos valores de diâmetro do rim de machos adultos de <i>Amphisbaena roberti</i> do estado de São Paulo, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	167
Figura 104 – Cortes histológicos de machos adultos de <i>Amphisbaena roberti</i>	169
Figura 105 – Localidades de coleta dos espécimes de <i>Amphisbaena trachura</i> adultos amostrados, e sua distribuição nos biomas e ecorregiões brasileiros.....	171
Figura 106 – Gráfico de dispersão das medidas de comprimento do maior folículo ou ovo de cada fêmea adulta de <i>Amphisbaena trachura</i> amostrada, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	172
Figura 107 – Cortes histológicos de ovidutos de <i>Amphisbaena trachura</i> adultas.....	174
Figura 108 – Gráfico de dispersão dos valores da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de <i>Amphisbaena trachura</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes (amostra completa).....	176
Figura 109 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular de <i>Amphisbaena trachura</i> adultos, separados por estações do ano, segundo a data de coleta dos espécimes (amostra completa).....	177

Figura 110 – Gráfico de dispersão dos valores da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de <i>Amphisbaena trachura</i> coletados no estado do Rio Grande do Sul, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	177
Figura 111 – Gráfico de dispersão das medidas de diâmetro do ducto deferente de machos adultos de <i>Amphisbaena trachura</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes e considerando a amostra completa.....	179
Figura 112 – Diagrama boxplot dos dados de diâmetro do ducto deferente de <i>Amphisbaena trachura</i> adultos, separados por estações do ano, segundo a data de coleta dos espécimes e considerando a amostra completa.....	180
Figura 113 – Gráfico de dispersão das medidas de diâmetro do ducto deferente de machos adultos de <i>Amphisbaena trachura</i> coletados no estado do Rio Grande do Sul, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	180
Figura 114 – Gráfico de dispersão das medidas de comprimento do rim de machos adultos de <i>Amphisbaena trachura</i> coletados no estado do Rio Grande do Sul, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	181
Figura 115 – Gráfico de dispersão das medidas de diâmetro do rim de machos adultos de <i>Amphisbaena trachura</i> coletados no estado do Rio Grande do Sul, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	181
Figura 116 – Cortes histológicos de machos adultos de <i>Amphisbaena trachura</i>	184
Figura 117 – Localidades de coleta dos espécimes de <i>Amphisbaena vermicularis</i> adultos amostrados, e sua distribuição nos biomas e ecorregiões brasileiros.....	187
Figura 118 – Gráfico de dispersão das medidas de comprimento do maior folículo ou ovo de cada fêmea adulta de <i>Amphisbaena vermicularis</i> amostrada em região de Cerrado ou Matas Secas de Chiquitano, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	188
Figura 119 – Cortes histológicos de ovidutos de <i>Amphisbaena vermicularis</i> adultas.....	189
Figura 120 – Gráfico de dispersão dos valores da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de <i>Amphisbaena vermicularis</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	191
Figura 121 – Diagrama boxplot dos dados volume testicular de <i>Amphisbaena vermicularis</i> adultos, separados por estações do ano, segundo a data de coleta dos espécimes.....	191
Figura 122 – Gráfico de dispersão das medidas de diâmetro do ducto deferente de machos adultos de <i>Amphisbaena vermicularis</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	192

Figura 123 – Gráfico de dispersão dos valores da regressão linear entre comprimento do rim e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de <i>Amphisbaena vermicularis</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	193
Figura 124 – Gráfico de dispersão dos valores da regressão linear entre diâmetro do rim e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de <i>Amphisbaena vermicularis</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	193
Figura 125 – Cortes histológicos de machos adultos de <i>Amphisbaena vermicularis</i> de região de Cerrado.....	194
Figura 126 – Rim e ducto deferente de <i>A. vermicularis</i> macho coletado em dezembro, com os túbulos do segmento sexual renal visíveis e mostrando enovelamento do ducto deferente.....	195
Figura 127 – Localidades de coleta dos espécimes de <i>Blanus cinereus</i> adultos amostrados, e sua distribuição nas ecorregiões da Península Ibérica.....	197
Figura 128 – Gráfico de dispersão dos dados de comprimento do maior folículo observado em cada fêmea adulta de <i>Blanus cinereus</i> amostrada, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	198
Figura 129 – Gráfico de dispersão dos resíduos resultantes da análise de regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal, de machos adultos de <i>Blanus cinereus</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	199
Figura 130 – Gráfico de dispersão dos dados de diâmetro do ducto deferente de <i>Blanus cinereus</i> adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes.....	200
Figura 131 – Gráfico de dispersão dos resíduos resultantes da análise de regressão linear entre comprimento do rim e comprimento rostro-cloacal, de machos adultos de <i>Blanus cinereus</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	201
Figura 132 – Gráfico de dispersão dos resíduos resultantes da análise de regressão linear entre diâmetro do rim e comprimento rostro-cloacal, de machos adultos de <i>Blanus cinereus</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	201
Figura 133 – Cortes histológicos de fêmeas de <i>Blanus mettetalii</i>	202
Figura 134 – Cortes histológicos de machos de <i>Blanus mettetalii</i>	204
Figura 135 – Localidades de coleta dos espécimes de <i>Trogonophis wiegmanni</i> adultos amostrados, e sua distribuição nas ecorregiões do norte da África.....	206
Figura 136 – Gráfico de dispersão dos valores de maior folículo ou ovo com embrião observado por fêmea adulta de <i>Trogonophis wiegmanni</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	207

Figura 137 – Localidades de coleta dos espécimes de <i>Blanus cinereus</i> adultos amostrados, e sua distribuição nas ecorregiões do norte da África.....	208
Figura 138 – Gráfico de dispersão das medidas de diâmetro do ducto deferente de machos adultos de <i>Trogonophis wiegmanni</i> , segundo as datas de coleta dos espécimes.....	208
Figura 139 – Cortes histológicos de fêmeas de <i>Trogonophis wiegmanni</i>	209
Figura 140 – Cortes histológicos de machos de <i>Trogonophis wiegmanni</i>	211
Figura 141 – Cladograma de Amphisbaenidae do Brasil, modificado de Mott e Vieites (2009), mostrando a distribuição das espécies com ciclos reprodutivos sazonais e assazonais em machos.....	216
Figura 142 – Cladograma de Amphisbaenidae do Brasil, modificado de Mott e Vieites (2009), mostrando a duração em meses da fase espermiogênica em cada espécie amostrada.....	218
Figura 143 – Cladograma de Amphisbaenidae do Brasil, modificado de Mott e Vieites (2009), mostrando a diferença de fase, em meses, entre o fim da espermiogênese nos machos e a ovulação nas fêmeas.....	221
Figura 144 – Cladograma de Amphisbaenidae do Brasil, modificado de Mott e Vieites (2009), mostrando a duração, em meses, do período no qual são observados espermatozoides nos ductos deferentes dos machos de cada espécie amostrada.....	222
Figura 145 – Mapas de distribuição das localidades de coleta das espécies com ciclos reprodutivos assazonais e sazonais, sobre gradiente de sazonalidade de precipitação.....	224
Figura 146 – Mapas de distribuição das localidades de coleta das espécies com ciclos reprodutivos assazonais e sazonais, sobre gradiente de sazonalidade de temperatura.....	225
Figura 147 – Fêmeas de <i>Amphisbaena alba</i> com ovos nos ovidutos ou folículos ovarianos aumentados.....	227
Figura 148 – Histograma de frequência do número de ovos observado por fêmea de <i>Amphisbaena infraorbitale</i>	229
Figura 149 – Gráfico de dispersão mostrando a relação entre o número de ovos observados por fêmea de <i>Amphisbaena infraorbitale</i> e o comprimento rostro-cloacal desses espécimes.....	230
Figura 150 – Gráfico de dispersão mostrando a relação entre a soma dos volumes dos ovos observados por fêmea de <i>Amphisbaena infraorbitale</i> e o comprimento rostro-cloacal desses espécimes.....	230

Figura 151 – Fêmea de <i>Amphisbaena infraorbitale</i> com dois ovos nos ovidutos, dispostos de maneira enfileirada (UFMT 3429).....	231
Figura 152 – <i>Amphisbaena mertensi</i> fêmeas, com ovos nos ovidutos, dispostos em linha....	232
Figura 153 – Gráfico de dispersão mostrando a relação entre o número de ovos observados por fêmea de <i>Amphisbaena munoai</i> e o comprimento rostro-cloacal desses espécimes.....	233
Figura 154 – Gráfico de dispersão mostrando a relação entre a soma dos volumes dos ovos observados por fêmea de <i>Amphisbaena munoai</i> e o comprimento rostro-cloacal desses espécimes.....	234
Figura 155 – Fêmea de <i>Amphisbaena munoai</i> , mostrando ovos em fila, ocupando boa parte da porção posterior da cavidade abdominal e deixando o intestino comprimido lateralmente (MCP 12070).....	234
Figura 156 – <i>Amphisbaena trachura</i> fêmea, mostrando nove ovos nos ovidutos, dispostos lado a lado na cavidade abdominal (MCP 5764).....	235
Figura 157 – Embrião de <i>Trogonophis wiegmanni</i> em estágio avançado de desenvolvimento, apresentando escamas pigmentadas.....	236
Figura 158 – <i>Trogonophis wiegmanni</i> fêmea com dois ovos no oviduto direito (MNCN 11484).....	237

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resumo das características dos ciclo reprodutivos de machos e fêmeas de <i>Amphisbaena alba</i>	69
Quadro 2 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de <i>Amphisbaena anomala</i> , inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos.....	81
Quadro 3 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de <i>Amphisbaena dubia</i> , inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos.....	95
Quadro 4 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de <i>Amphisbaena infraorbitale</i> , inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos.....	107
Quadro 5 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de <i>Amphisbaena kingi</i> , inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos.....	118
Quadro 6 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de <i>Amphisbaena mertensi</i> , inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos.....	133
Quadro 7 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de <i>Amphisbaena microcephala</i> , inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos.....	148
Quadro 8 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de <i>Amphisbaena munoai</i> , inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos.....	161
Quadro 9 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de <i>Amphisbaena roberti</i> , inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos.....	170
Quadro 10 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de <i>Amphisbaena trachura</i> , inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos.....	185
Quadro 11 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de <i>Amphisbaena vermicularis</i> , inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos	195
Quadro 12 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de <i>Blanus mettetalii</i> , inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos.....	205

Quadro 13 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de <i>Trogonophis wiegmanni</i> , inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos.....	212
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies amostradas neste estudo, número de espécimes examinados e coleções zoológicas onde os mesmos se encontram depositados.....	41
Tabela 2 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de comparação de médias das variáveis obtidas de machos de <i>Amphisbaena alba</i>	57
Tabela 3 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de <i>Amphisbaena anomala</i>	74
Tabela 4 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de <i>Amphisbaena dubia</i>	88
Tabela 5 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de <i>Amphisbaena infraorbitale</i>	101
Tabela 6 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de <i>Amphisbaena kingi</i>	111
Tabela 7 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de <i>Amphisbaena kingi</i>	125
Tabela 8 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de <i>Amphisbaena microcephala</i>	142
Tabela 9 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de <i>Amphisbaena munoai</i>	153
Tabela 10 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de <i>Amphisbaena roberti</i>	167
Tabela 11 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de <i>Amphisbaena trachura</i>	178
Tabela 12 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de <i>Amphisbaena vermicularis</i>	190
Tabela 13 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de <i>Blanus cinereus</i>	199
Tabela 14 – Tabela sinóptica dos principais eventos do ciclo reprodutivo das espécies analisadas.....	215
Tabela 15 – Tabela sinóptica da duração, em meses, de fases representativas do ciclo reprodutivo das espécies amostradas.....	219

Tabela 16 – Números máximo e mínimo de ovos observados por fêmea, e número de fêmeas grávidas amostrado por espécie.....	226
Tabela 17 – Número e comprimento dos ovos observados em fêmeas de <i>Amphisbaena dubia</i>	228
Tabela 18 – Médias, desvios-padrão (DP) e valores p obtidos em análise de variância, para comparação das medidas de comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento caudal (CC), diâmetro do corpo (DC) e razão entre diâmetro do corpo e comprimento rostro-cloacal de machos e fêmeas.....	239

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
1.1. BIOLOGIA REPRODUTIVA DE AMPHISBAENIA: LITERATURA	34
2 OBJETIVOS	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 EXAME PRIMÁRIO DOS ESPÉCIMES	42
3.2 ANÁLISES DE CICLO REPRODUTIVO	42
3.2.1 Ciclos reprodutivos dos machos	43
3.2.2 Ciclos reprodutivos das fêmeas	45
3.2.3 Análises histológicas	46
3.2.4 Análises comparativas de ciclo reprodutivo	47
3.3 FECUNDIDADE	47
3.4 DIMORFISMO SEXUAL	48
4 RESULTADOS	49
4.1 CICLOS REPRODUTIVOS E HISTOLOGIA DAS VIAS GENITAIS	49
4.1.1 <i>Amphisbaena alba</i>	49
4.1.2 <i>Amphisbaena anomala</i>	69
4.1.3 <i>Amphisbaena dubia</i>	83
4.1.4 <i>Amphisbaena infraorbitale</i>	95
4.1.5 <i>Amphisbaena kingi</i>	107
4.1.6 <i>Amphisbaena mertensi</i>	118
4.1.7 <i>Amphisbaena microcephala</i>	133
4.1.8 <i>Amphisbaena munoai</i>	149
4.1.9 <i>Amphisbaena roberti</i>	161
4.1.10 <i>Amphisbaena trachura</i>	170
4.1.11. <i>Amphisbaena vermicularis</i>	185
4.1.12 <i>Blanus cinereus</i>	196
4.1.13. <i>Blanus mettetalii</i>	202
4.1.14. <i>Trogonophis wiegmanni</i>	205
4.2. ANÁLISE COMPARATIVA DOS CICLOS REPRODUTIVOS	212
4.2.1 Sobreposição de características dos ciclos na filogenia	212
4.2.2 Sazonalidade dos ciclos reprodutivos de machos e sazonalidade climática	223

4.3 FECUNDIDADE.....	226
4.4 DIMORFISMO SEXUAL.....	237
REFERÊNCIAS	255

1 INTRODUÇÃO

Os Amphisbaenia são uma subordem de Squamata que conta atualmente com 19 gêneros e cerca de 180 espécies, distribuídas em seis famílias (GANS, 2005; VIDAL et al., 2007; MOTT; VIEITES, 2009). O monofiletismo do grupo tem sido apontado tanto por estudos morfológicos como por moleculares (KEARNEY, 2003; KEARNEY; STUART, 2004; MACEY et al., 2004; TOWNSEND, 2004; CONRAD, 2008). Todos os seus representantes são ápodos, com exceção de um gênero, *Bipes* (família Bipedidae), de distribuição restrita a regiões do México. A distribuição do grupo ainda abrange a Flórida, onde ocorre a família monotípica Rhineuridae; Cuba, onde se distribuem os representantes da família Cadeidae; Europa e Norte da África, área de ocorrência da família Blanidae; Norte da África e Oriente Médio, onde se encontram os representantes da família Trogonophidae. A maior família do grupo, Amphisbaenidae, tem ampla distribuição na América do Sul, América Central e África, possui 11 gêneros e conta com aproximadamente 165 espécies descritas até o momento (GANS, 2005). Dessas, 68 ocorrem no Brasil, inclusas em dois gêneros – *Amphisbaena* e *Mesobaena* (MOTT; VIEITES, 2009; HOOGLMOED et al., 2009; BÉRNILS; COSTA, 2012). Sendo assim, cerca de um terço dos representantes da maior família de Amphisbaenia pode ser encontrado no Brasil.

A distribuição desse grupo no país é bastante ampla, abrangendo desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul. Algumas espécies têm grandes áreas de ocorrência, incluindo desde estados do Norte do país até o Sudeste, e abarcando diferentes regiões climáticas e domínios morfoclimáticos¹. Esse é o caso, por exemplo, de *Amphisbaena alba* Linné, 1758 e *Amphisbaena mertensi* Strauch, 1881. Outras, porém, parecem restritas a regiões menos extensas, encontrando apenas um tipo macroclimático. É o caso de *Amphisbaena anomala* Barbour, 1914, encontrada em região amazônica, e *A. munoai* Kapplénbach, 1960, encontrada apenas no Rio Grande do Sul e Uruguai, áreas de clima temperado.

Grande parte das espécies brasileiras tem ocorrência registrada apenas em pequenas regiões ou mesmo nas proximidades de sua localidade tipo (GANS, 2005). Porém, é importante observar que a coleta de Amphisbaenia é difícil, já que é rara a vinda dos mesmos à superfície, e que esses animais dificilmente são capturados em armadilhas como os “pitfalls”. Faltam metodologias para sua coleta, que pode ser ocasional – como o encontro de

¹ Classificação das regiões climáticas brasileiras segundo IBGE; disponível em www.ibge.gov.br. Classificação de domínios morfoclimáticos segundo Ab'Sáber (1967).

espécimes na superfície ou atropelados em estradas – e muitas vezes “oportunista” – como a captura em resgates de fauna, ou de animais desenterrados por tratores e arados. Assim, os registros de ocorrência limitados a poucas localidades são possivelmente artefatos da dificuldade de sua coleta.

Quanto às relações filogenéticas entre os representantes da subordem Amphisbaenia, estudos baseados em dados moleculares sugerem que a família Amphisbaenidae é monofilética, e grupo irmão de Trogonophidae (KEARNEY; STUART, 2004; MACEY et al., 2004; VIDAL et al., 2007). Porém, dados morfológicos sugerem parafiletismo para essa família (KEARNEY, 2003), sendo que seus representantes com a cabeça achatada dorso-ventralmente ("cabeça em forma de pá") são inclusos na superfamília Rhineuroidea – composta pela família Rhineuridae e gêneros com cabeça em forma de pá presentes na África (*Dalophia* e *Monopeltis*) e na América do Sul (*Aulura* e *Leposternon*, atualmente incluídos no gênero *Amphisbaena*) –, e seus representantes com cabeças arredondadas ou em forma de quilha compõem a família Amphisbaenidae – que junto com Trogonophidae formam a superfamília Amphisbaenoidea. Em tal análise, dos sete antigos gêneros encontrados no Brasil (seis dos quais são hoje incluídos no gênero *Amphisbaena*) (MOTT; VIEITES, 2009), três – *Amphisbaenia*, *Bronia* e *Anops* – incluem-se entre os Amphisbaenoidea, e dois – *Aulura* e *Leposternon* – entre os Rhineuroidea. Os gêneros *Cercolophia* e *Mesobaena* não foram incluídos naquele estudo.

Kearney e Stuart (2004), por sua vez, em estudo de filogenia utilizando caracteres moleculares, apresentaram evidências não apenas do monofiletismo dos Amphisbaenidae da América do Sul, mas também da parafilia do gênero *Amphisbaena*, o qual concentra o maior número de espécies da família. Em relação à família Amphisbaenidae em especial, Mott e Vieites (2009) realizaram um estudo filogenético com base em marcadores mitocondriais e nucleares, incluindo na análise seis dos sete gêneros sul-americanos até então reconhecidos – exceção feita a *Mesobaena* –, amostrando 29 espécies. Seus resultados apontaram a parafilia dos gêneros *Amphisbaena*, *Cercolophia* e *Bronia*, evidenciando a extensa ocorrência de homoplasia de caracteres morfológicos como forma da cabeça, presença de quilha na cauda e autotomia, normalmente utilizados para definição dos gêneros. Com base nesses resultados, e optando pela alteração com menor custo taxonômico, os autores colocam todas as espécies dos gêneros *Anops*, *Aulura*, *Bronia*, *Cercolophia* e *Leposternon* no gênero *Amphisbaena*, de acordo com a norma de prioridade estabelecida pela Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN). O gênero *Amphisbaena* passou, então, a abrigar quase todas as espécies brasileiras da família Amphisbaenidae, com exceção de *Mesobaena rhachicephala*

(HOOGMOED et al., 2009), espécie descrita após o referido estudo. O mesmo estudo sugere ainda que *Amphisbaena alba* e *Amphisbaena microcephala*, ambas com distribuição ampla, são complexos de espécies. Sendo assim, segundo os próprios autores, mais evidências moleculares e morfológicas, como a anatomia interna, são necessárias para discutir a taxonomia e filogenia das espécies do gênero.

Quanto ao estudo da biologia reprodutiva e ciclos reprodutivos, os répteis de regiões tropicais e subtropicais em geral, aí incluídas as Amphisbaenia, foram historicamente menos estudados em comparação com as espécies de regiões temperada (FITCH, 1970; SAINT-GIRONS, 1982; PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS; MARQUES, 2007; MATHIES, 2011). Os estudos dedicados à análise de aspectos da biologia reprodutiva de répteis neotropicais têm aumentado nas últimas décadas, especialmente com a análise de espécimes de coleção, mas essas regiões ainda requerem especial atenção nesse aspecto (PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS; MARQUES, 2007; MATHIES, 2011).

Os ciclos reprodutivos de répteis Squamata em geral e os fatores climáticos e ambientais que os influenciam vêm sendo estudados, portanto, principalmente com base em informações de espécies de zonas temperadas. Considerando a época e a duração da espermiogênese, e também a duração da fase de estocagem de esperma, Saint-Girons (1982) classificou os ciclos reprodutivos de machos de serpentes em quatro tipos. No primeiro, chamado de pós-nupcial, a espermatogênese se inicia após a cópula, na segunda metade da primavera, e cessa antes do inverno. Durante a estação mais fria, os espermatozoides produzidos até então são estocados nos ductos deferentes até a próxima cópula, na primavera seguinte. Já no chamado tipo misto, a espermatogênese começa na primavera, é interrompida ou diminuída durante o inverno, e então retomada na primavera seguinte, antes da cópula. Esses dois primeiros tipos são encontrados em serpentes de regiões temperadas, nas quais muitas vezes há uma fase de hibernação durante o inverno. O terceiro tipo de ciclo espermatogênico, chamado de pré-nupcial, é encontrado em todas as regiões climáticas, com exceção de zonas temperadas frias nas quais há uma fase de hibernação. Nesse tipo de ciclo, a espermatogênese é completada na própria estação de cópula. Um quarto tipo espermatogênico, dito contínuo e ainda pouco estudado, é observado apenas em espécies de zonas tropicais, e se caracteriza pela produção de espermatozoides ao longo de todo o ano. Mathies (2011), no entanto, propõe o abandono do termo "contínuo", já que o mesmo sugere que todos os processos envolvidos no ciclo reprodutivo se mantêm constantes ao longo de todo o ano, o que nunca foi observado em qualquer espécie.

Segundo Saint-Girons (1982), o principal fator ambiental limitante sobre o ciclo reprodutivos dos machos é a temperatura, sendo que apenas os ciclos de tipo pré-nupcial e misto ocorrem em regiões nas quais há uma fase de hibernação. Nas regiões onde não há hibernação, a sucessão de fases do ciclo dos machos seria dependente apenas do ciclo das fêmeas, esse sim, por sua vez, dependente de fatores como a sazonalidade de precipitação. Já Fitch (1970) afirma que, para lagartos de regiões áridas, a precipitação pode ser um fator limitante, de modo que os ciclos reprodutivos tanto de machos quanto de fêmeas podem ser suprimidos em parte ou completamente em anos em que a precipitação é abaixo do ótimo. Nesses casos, a fase reprodutiva estaria limitada aos meses mais úmidos. Uma parte das espécies de zonas tropicais, por outro lado, e ainda segundo Fitch (1970), têm longas fases reprodutivas que chegam a se estender por todo o ano.

Em trabalho recente sobre os ciclos reprodutivos de serpentes tropicais, Mathies (2011) classifica os ciclos reprodutivos de machos em cíclicos descontínuos – quando há uma fase de repouso reprodutivo –, cíclicos contínuos – quando as gônadas não ficam quiescentes em nenhum período do ano, mas apresentam uma fase de atividade reduzida –, e acíclicos – quando as gônadas apresentam atividade constante ao longo do ano. O autor sugere ainda que nas espécies cujos machos são cíclicos (contínuos ou descontínuos), o tipo de ciclo observado na população depende da existência ou não de sincronia entre os ciclos dos indivíduos. Assim, se os machos de uma espécie apresentam uma fase de repouso testicular, mas essa fase não é sincronizada entre todos os indivíduos, podendo ocorrer em diferentes épocas do ano, ao se considerar a população, poderão ser amostrados machos reprodutivos ao longo de todo o ano. O autor chama a atenção, ainda, para a necessidade de se estudar histologicamente as gônadas de machos para correta caracterização do ciclo quanto à sua sazonalidade ou assazonalidade.

1.1. BIOLOGIA REPRODUTIVA DE AMPHISBAENIA: LITERATURA

A biologia reprodutiva de *Amphisbaenia* em particular é muito pouco conhecida, bem como diversos aspectos de sua história natural. Andrade et al. (2006) realizaram um levantamento dos estudos realizados sobre a biologia reprodutiva do grupo, e encontraram informações de apenas 22 espécies, pertencentes a 11 gêneros, sendo que dessas, oito espécies são encontradas no Brasil (*A. alba*, *A. amazonica*, *A. vermicularis*, *A. kingi*, *A. roberti*, *A. microcephala* e *A. infraorbitale*). Porém, a maioria desses trabalhos traz informações pontuais

a respeito de eventos isolados do ciclo reprodutivo das espécies, como ovipostura ou o encontro de ovos ou folículos vitelogênicos nas fêmeas. É o caso de seis das oito espécies brasileiras referidas acima. Estudos revelando dados sobre o ciclo reprodutivo como um todo, de machos ou fêmeas, haviam sido realizados até então apenas para oito espécies de *Amphisbaenia* – incluindo apenas duas espécies com ocorrência no Brasil, *A. alba* e *A. kingi*, embora essa última tivesse sido estudada apenas em localidades na Argentina.

Após essa revisão, Balestrin e Cappellari (2011) estudaram o ciclo reprodutivo de *Amphisbaena munoai* e *Amphisbaena kingi* do sul do Brasil (região de clima temperado úmido), com base na medição de testículos, folículos ovarianos e ovos. Os autores encontraram evidências de reprodução sazonal para ambas as espécies, com a cópula ocorrendo na primavera. Vega (2001) também encontrou dados indicativos de um ciclo sazonal, com a fase reprodutiva ocorrendo entre julho e novembro – entre o inverno e a primavera – em *Amphisbaena kingi* da Argentina.

As demais espécies para as quais foram realizados estudos observando aspectos do ciclo reprodutivo são *Amphisbaena alba*, *Bipes tridactylus*, *B. canaliculatus*, *B. biporus*, *Trogonophis wiegmanni*, *Blanus mettetalii* e *Blanus cinereus*. Em relação a *Amphisbaena alba*, Colli e Zamboni (1999) realizaram um estudo com animais do centro-oeste brasileiro – provindos de regiões de Cerrado –, e sugeriram um ciclo reprodutivo sazonal, com a fase reprodutiva ocorrendo entre fevereiro e abril (no final da estação chuvosa), baseados na distribuição da amostragem de espécimes adultos entre os meses do ano. Já Gorzula et al. (1976), trabalhando com *A. alba* da Venezuela – região amazônica –, sugerem que a espécie deva se reproduzir entre agosto e setembro, baseado no aumento de volumes testiculares nesse período. No entanto, essa observação foi feita com base nas medidas de testículos de apenas 3 machos, coletados em agosto, setembro e outubro.

Papenfuss (1982) pôde estimar, para as três espécies do gênero *Bipes* – *B. tridactylus*, *B. canaliculatus* e *B. biporus*, coletados em regiões de clima árido, com precipitação sazonal restrita ao fim do verão –, a época de ovipostura, o período de incubação, a idade de maturidade das fêmeas, e a taxa de crescimento dos jovens em seu primeiro ano de vida. O autor sugere um ciclo anual para as fêmeas de *B. tridactylus*, e com duração superior a um ano para as outras duas espécies. Em *B. tridactylus* e *B. canaliculatus*, a ovipostura se dá em janeiro, e os filhotes nascem em abril. Já *B. biporus* coloca seus ovos em julho, e a eclosão ocorre em setembro.

Todas as espécies comentadas até agora, no entanto, tiveram aspectos de seu ciclo reprodutivo analisados apenas com base na observação macroscópica das gônadas, sem que

tenham sido realizadas análises histológicas das mesmas. O estudo mais completo de ciclo reprodutivo de *Amphisbaenia* publicado até agora é o de Bons e Saint-Girons (1963), no qual os autores apresentam dados de morfologia geral e análises histológicas das gônadas para discutir o ciclo reprodutivo de *Trogonophis wiegmanni* e *Blanus mettetalii* (representantes das famílias Trogonophidae e Blanidae, respectivamente). Ambas as espécies foram amostradas no Marrocos – em região de clima mediterrâneo, com verão quente e seco (de julho a setembro) e inverno frio e chuvoso (de janeiro a março). A partir das análises histológicas os autores puderam caracterizar o ciclo espermatogênico dessas duas espécies, que apresentaram uma fase de produção de esperma notadamente rápida, entre maio e a primeira metade de junho – mês no qual também acontece a cópula –, e uma involução também muito rápida dos testículos após a espermiogênese. O máximo de involução dos testículos ocorre em julho, apenas um mês após o pico de produção de espermatozóides, e é bastante acentuada, ficando os túbulos seminíferos semelhantes aos dos animais imaturos. De outubro a março, as espermatogônias voltam a se multiplicar lentamente, mas não há produção de espermátócitos nesse período. A espermatogênese só será retomada de fato na primavera, em março. Tal ciclo é classificado pelos autores como pré-nupcial, devido à produção de espermatozóides ocorrer antes da cópula, na mesma estação reprodutiva, e não haver estocagem de esperma por longo período de tempo. Em relação às fêmeas, os autores obtiveram evidências de ciclos reprodutivos longos, com duração superior a um ano. Os ovidutos e ovários são caracterizados de maneira geral quanto à histologia, e a região da cloaca tem sua morfologia descrita e ilustrada por lâminas histológicas.

Em estudo de campo com *T. wiegmanni*, Martín et al. (2012) também observaram que as fêmeas da população estudada não entravam todas em fase reprodutiva em um mesmo ano. O mesmo foi observado por Gil, Guerrero e Pérez-Mellado (1993) em *Blanus cinereus* da região central da Espanha. Esses autores, no entanto, observaram que as fêmeas com maior comprimento apresentam maior frequência reprodutiva em relação às fêmeas mais jovens. No mesmo estudo, os autores observaram testículos maiores entre março e maio em *B. cinereus*, sugerindo reprodução na primavera para essa espécie.

Em relação ao número de filhotes gerados por fêmea, Andrade et al. (2006) observaram, com base nos trabalhos publicados até então, que uma baixa fecundidade é comum para o grupo, já que na maior parte dos casos relatados na literatura o número de ovos ou embriões observados por fêmea varia de 2 a 6. Os autores observam ainda que, nas quatro espécies examinadas por eles – *A. alba*, *A. mertensi*, *A. roberti* e *A. infraorbitale* – os ovos eram alongados e encontravam-se dispostos em fila na cavidade abdominal da fêmea, mesmo

quando haviam ovos nos dois ovidutos, e discutem que tal disposição deve produzir uma menor distensão no diâmetro do corpo da fêmea.

Quanto ao modo reprodutivo de *Amphisbaenia* há poucas informações disponíveis, mas a maior parte das espécies para as quais há informação a esse respeito é ovípara. A ocorrência de viviparidade é conhecida até o momento apenas em *Trogonophis wiegmanni* (BONS; SAINT-GIRONS, 1963). Já entre os representantes da família Amphisbaenidae, foram observadas fêmeas com embriões em avançado estágio de desenvolvimento e sem sinal de casca em *Loveridgea ionidesii* (GANS; KRAKLAU, 1989) e *Monopeltis capensis* (VISSER, 1967; BROADLEY *et al.*, 1976). Esses relatos evidenciam a ocorrência de longos períodos de retenção do embrião pelas fêmeas dessas espécies, embora não se possa até agora afirmar se as mesmas mantêm essa retenção até o completo desenvolvimento do embrião e nascimento, o que caracterizaria viviparidade. Há registros de ovipostura, caracterizando oviparidade, para *A. alba* (BARROS-FILHO; NASCIMENTO, 2003), *A. infraorbitale* (JARED; ANTONIAZZI; ALMEIDA-SANTOS, 1997; ANDRADE *et al.*, 2006), *A. manni* (GANS; ALEXANDER, 1962), *A. mertensi* (ANDRADE *et al.*, 2006), *A. microcephala* (GANS, 1971; GOELDI, 1898), *Bipes tridactylus* (PAPENFUSS, 1982) e *Rhineura floridana* (CARR, 1949).

Outro aspecto que pode trazer informações importantes acerca do ciclo reprodutivo de espécies de *Amphisbaenia* é a análise do segmento sexual renal (SSR). Fox (1977) fornece uma revisão sobre as características e possíveis funções dessa estrutura em répteis. O SSR é formado por uma região do túbulo coletor do néfron que, nos machos maduros, hipertrofia-se e torna-se secretora, sendo facilmente distinguível dos túbulos adjacentes. Situa-se normalmente na região terminal do néfron, e em *Amphisbaenia* e alguns "lagartos" inclui todo o túbulo coletor (SAINT-GIRONS, 1972). Segundo Fox (1977), sua hipertrofia está relacionada a hormônios androgênicos secretados pelos testículos. A função da secreção do segmento sexual renal ainda não está esclarecida, mas pode estar relacionada à motilidade, ativação ou nutrição dos espermatozoides. Em lagartos, é normalmente observada uma variação evidente no desenvolvimento do segmento sexual renal ao longo do ciclo reprodutivo, sendo que o diâmetro dos túbulos e a altura das células aumentam na época de acasalamento. Essas células passam também a apresentar grânulos de secreção. Já em serpentes, não se observa uma grande variação na hipertrofia desses túbulos, permanecendo o SSR sempre secretor após a maturidade sexual. Em *Blanus cinereus* e *Trogonophis wiegmanni* (BONS; SAINT-GIRONS, 1963), o segmento sexual do rim desenvolve-se marcadamente em junho, época em que ocorre a fase espermiogênica e a cópula nessas

espécies. Valverde et al. (2005) analisaram ainda o SSR de três espécies da família Amphisbaenidae – *Amphisbaena alba*, *A. vermicularis* e *A. polystega* –, e observaram que essa região se apresentava hipertrofiada e secretora em todos os machos em fase espermiogênica. Assim, a observação histológica do SSR aparece como importante ferramenta para uma melhor análise do ciclo reprodutivo desses animais.

Tendo em vista o exposto, nota-se que existe uma grande lacuna no estudo da biologia reprodutiva de Amphisbaenia. No que se refere ao estudo dos ciclos reprodutivos, particularmente, além haver informações disponíveis para poucas espécies, há uma carência de dados histológicos, caracterizando com mais detalhe os ciclos de machos e fêmeas. Assim, um estudo comparativo do ciclo reprodutivo e da histologia das vias genitais de variadas espécies da família Amphisbaenidae, tendo como pano de fundo as relações filogenéticas da mesma, poderia contribuir não apenas melhorando o conhecimento acerca da biologia reprodutiva do grupo, até agora tão pouco conhecida, mas trazendo novos elementos para a discussão das relações filogenéticas entre as espécies do grupo e de como as características reprodutivas se relacionam com a história evolutiva dessas espécies.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivos:

- Analisar o ciclo reprodutivo de 11 espécies brasileiras da família Amphisbaenidae, com base na anatomia e histologia das vias genitais de machos e fêmeas;
- comparar as informações obtidas entre as espécies estudadas, discutindo-as com relação à hipótese filogenética sugerida para as Amphisbaenidae brasileiras, disponível na literatura;
- comparar preliminarmente os ciclos reprodutivos observados com variações anuais de temperatura e precipitação;
- estimar a fecundidade e verificar a ocorrência de dimorfismo sexual nas espécies amostradas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Considerando que para a realização de análises do ciclo reprodutivo de uma espécie é necessária a amostragem de indivíduos em diversos meses do ano, e levando em conta ainda a dificuldade de observação e amostragem em campo de *Amphisbaenidae*, bem como a necessidade de amostragem de diferentes espécies para este estudo, o mesmo foi baseado no exame de espécimes depositados em coleções zoológicas. A escolha das espécies para estudo, objetivando a obtenção de uma amostra representativa das *Amphisbaenidae* brasileiras, levou em conta a disponibilidade de espécimes nessas coleções, com datas de coleta distribuídas entre os meses do ano.

Levando em conta essas considerações, foram incluídas neste estudo 11 espécies brasileiras do gênero *Amphisbaena*, com diferentes áreas de ocorrência, amostradas em oito coleções nacionais, a saber: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Coleção Referência do Instituto Butantan (CRIB), Museu de História Natural do Capão da Imbuia (MHNCI), Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (CHUNB), Coleção de Répteis do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas (ZUEC), Coleção da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), e Museu Nacional (MNRJ). Foram ainda amostrados espécimes coletados por Ricardo J. Sawaya, entre os anos de 1998 e 2002 na região de Itirapina (interior do estado de São Paulo), e que estão identificados pela sigla ITS. Esses espécimes seriam incorporados à Coleção Referência do Instituto Butantan, mas foram perdidos em um incêndio antes de receberem seus números de tombo CRIB.

Foram amostrados ainda espécimes de *Blanus cinereus* e *Trogonophis wiegmanni*, espécies das famílias Blanidae e Trogonophidae, e lâminas histológicas de *Blanus mettetalii* e *T. wiegmanni*. Essas espécies, com áreas de ocorrência na Península Ibérica e norte da África, foram incluídas na amostra visando sua utilização como grupo externo na comparação das características dos ciclos reprodutivos tendo como referência a árvore filogenética das espécies de *Amphisbaenidae*. Os espécimes e lâminas examinados pertencem às coleções do Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris) (MNHN), Estación Experimental de Zonas Áridas (Almería, Espanha) (EEZA) e Museo Nacional de Ciencias Naturales (Madri) (MNCN). As lâminas de *B. mettetalii* e *T. wiegmanni* foram produzidas por Saint-Girons para o estudo do ciclo reprodutivo dessas espécies (BONS; SAINT-GIRONS, 1963), e foram revisitadas no presente estudo.

A tabela 1 resume a lista de espécies analisadas neste estudo, as coleções nas quais as mesmas foram amostradas e o número de espécimes examinados. *Blanus mettetalis* não está incluída nessa lista, por terem sido analisadas dessa espécie apenas lâminas histológicas preservadas no MNHN.

Tabela 1 – Espécies amostradas neste estudo, número de espécimes examinados e coleções zoológicas onde os mesmos se encontram depositados

Espécie	Coleções visitadas	Número de espécimes examinados
<i>Amphisbaena alba</i> Linné, 1758	CHUNB, CRIB, ZUEC, UFMT	112
<i>Amphisbaena anomala</i> Barbour, 1914	MPEG	46
<i>Amphisbaena dubia</i> Müller, 1924	CRIB	50
<i>Amphisbaena infraorbitale</i> Berthold, 1859	UFMT, CHUNB	55
<i>Amphisbaena kingi</i> Bell, 1833	PUCRS	66
<i>Amphisbaena mertensi</i> Strauch, 1881	CRIB, ZUEC, UFMT, MNRJ, MHNCI	101
<i>Amphisbaena microcephala</i> Wagler, 1824	CRIB, MHNCI, UFMT, MPEG	113
<i>Amphisbaena munoai</i> Kapplénbach, 1960	PUCRS	189
<i>Amphisbaena roberti</i> Gans, 1964	CHUNB, CRIB, ZUEC, UFMT, MNRJ	51
<i>Amphisbaena trachura</i> Cope, 1885	PUCRS, MHNCI	74
<i>Amphisbaena vermicularis</i> Wagler, 1824	CHUNB, UFMT, MNRJ	37
<i>Blanus cinereus</i> Vandelli, 1797	MNHN, EEZA, MNCN	70
<i>Trogonophis wiegmanni</i> Kaup, 1830	MNHN, EEZA, MNCN	48
Total		1012

3.1 EXAME PRIMÁRIO DOS ESPÉCIMES

Todos os espécimes amostrados tiveram medidos seu comprimento rostro-cloacal (da extremidade rostral à abertura cloacal), comprimento caudal (da abertura da cloaca à extremidade da cauda) e diâmetro do corpo. Essa última medida foi sempre tomada no quarto posterior do corpo, e apenas em espécimes que não estavam previamente dissecados. O comprimento rostro-cloacal (CRC) foi medido com uma fita métrica, até o milímetro mais próximo, e as demais medidas foram realizadas com paquímetro digital Digimess®, com precisão de 0,1 mm. Então, foi realizada a dissecação com uma incisão ventral no quarto posterior do corpo, sobre as gônadas. O estado de maturidade dos espécimes foi então inferido considerando o aspecto dos ductos genitais dos mesmos, de acordo com o observado por Santos (2009) com respeito à determinação de maturidade em *Amphisbaena microcephala*. No caso das fêmeas, aquelas com ovidutos de aspecto liso e transparente foram consideradas imaturas, ao passo que ovidutos opacos ou translúcidos e com a sua região anterior pregueada foram considerados indicativos de maturidade sexual, assim como a presença de ovos ou folículos em vitelogênese secundária. Já os machos foram considerados imaturos quando mostravam ductos deferentes lisos e transparentes, e maduros quando esses ductos apresentavam-se translúcidos ou opacos, e contorcidos – característica essa por vezes observada somente sob estereomicroscópio. Essa correspondência entre a opacidade dos ductos e a maturidade foi posteriormente verificada nos espécimes amostrados para análise histológica, por meio da observação das gônadas sob microscopia de luz. Apenas os espécimes adultos foram utilizados para as análises de ciclo reprodutivo, fecundidade e dimorfismo sexual de tamanho do corpo.

3.2 ANÁLISES DE CICLO REPRODUTIVO

Para estudar as características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas das espécies analisadas, foram examinados e medidos gônadas, ductos genitais e rins dos espécimes, durante as disseções e sob microscopia de luz, segundo as metodologias descritas a seguir para machos e fêmeas.

3.2.1 Ciclos reprodutivos dos machos

Durante as disseções dos machos, foram tomadas as medidas de comprimento, largura e altura dos testículos para cálculo de volume dos mesmos. Para esse cálculo, foi utilizada a fórmula de volume do elipsóide ($V = 4/3\pi \cdot r1 \cdot r2 \cdot r3$, onde $r1$, $r2$ e $r3$ são os três raios do testículo). Foi feita então a soma dos volumes dos testículos direito e esquerdo, resultando numa medida de volume testicular para cada indivíduo. Também foi medido, durante disseção, o diâmetro da porção posterior do ducto deferente, região que pode apresentar estocagem de espermatozoides (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004). Foram medidos ainda o comprimento dos rins e o diâmetro da porção anterior desse órgão, a fim de se observar a ocorrência de variações ao longo do ano que poderiam estar relacionadas ao ciclo do segmento sexual renal. As medidas de rim e ducto deferente foram tomadas sempre dos órgãos direitos, para padronização, salvo quando os mesmos se encontravam em mau estado de preservação. Todas as medidas de órgãos foram feitas com paquímetro digital Digimess®, com precisão de 0,1 mm.

Os dados assim obtidos foram então analisados quanto à ocorrência de variações ao longo do ano, considerando as datas de coleta dos espécimes. Para tanto, os mesmos foram agrupados por estações do ano. Considerando que, entre as espécies amostradas, algumas apresentam grandes áreas de ocorrência, como *A. alba* (GANS, 1962; GANS, 2005), para se evitar erros na análise devidos a possíveis diferenças entre os ciclos de populações de regiões com características climáticas distintas, atentou-se para a distribuição das localidades de coleta dos espécimes. Assim, para cada espécie, foram plotadas as localidades de proveniência de cada espécime amostrado, sobre os mapas de biomas e de ecorregiões brasileiros, por meio do software ArcGIS ®. Foram utilizados para isso o mapa de biomas disponibilizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), e o mapa de ecorregiões proposto por Olson et al. (2001), e que considera fatores biogeográficos. A partir da distribuição observada, os espécimes foram agrupados por regiões para análise. A divisão dos dados por estações também levou em conta a distribuição das localidades de coleta. Espécies amostradas em regiões de Cerrado, por exemplo, tiveram seus dados divididos entre as estações seca e chuvosa, considerando as características climáticas dessa região (NIMER, 1979; AB'SÁBER, 2007).

Para analisar a ocorrência de variação entre as estações nas medidas de volume testicular, diâmetro do ducto deferente, e comprimento e diâmetro do rim, cada uma dessas variáveis foi primeiramente submetida a uma análise de regressão linear, tendo como variável independente o comprimento rostro-cloacal (CRC), para evitar erros em caso de variáveis diretamente relacionadas ao tamanho do corpo. Nos casos em que se observou relação significativa entre essas variáveis ($p < 0,05$), a variação das medidas de interesse ao longo do ano foi testada por meio de análise de covariância (ANCOVA), tendo como covariável o CRC. Quando a variável em questão não se mostrou significativamente relacionada ao CRC, sua variação ao longo do ano foi testada por meio de análise de variância (ANOVA).

Nos casos em que as análises de ANOVA ou ANCOVA apontaram diferença significativa entre as médias das estações, os dados foram submetidos aos testes post-hoc de Tukey e de Games-Howell para determinar em qual estação houve essa variação. O teste de Games-Howell foi utilizado paralelamente ao de Tukey por ser eficiente na análise com números amostrais diferentes entre os níveis do fator, o que foi recorrente entre as espécies analisadas.

Ainda precedendo as análises de ANOVA e ANCOVA, os dados foram submetidos testes de homocedasticidade (teste de Levene) e de normalidade (teste de Shapiro-Wilk), para verificar a adequação da amostra aos pressupostos das referidas análises de comparação de médias. Nos casos em que um desses pressupostos não foi atendido, os dados foram submetidos a transformação logarítmica. Aquelas distribuições que não atenderam aos pressupostos mesmo após transformação foram analisadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para todas as análises estatísticas, foi utilizado o software SPSS®. O valor crítico assumido foi de $\alpha = 0,05$.

Também foram utilizados, nas análises de variação de volumes testiculares, diâmetro dos ductos deferentes de comprimento e diâmetro dos rins ao longo do ano, gráficos de dispersão dessas medidas segundo as datas de coleta dos espécimes, o que permite observar o ciclo de variação das mesmas. No caso de variáveis que apresentaram relação significativa com o CRC, foram plotados nesses gráficos de dispersão não os dados originais, mas os resíduos da análise de regressão linear entre variável analisada e o comprimento rostro-cloacal, eliminando dessa forma o efeito desse último na dispersão dos pontos. No caso das medidas de diâmetro dos ductos deferentes, os pontos plotados no gráfico foram ainda diferenciados segundo o estado de enovelamento desses ductos. Os dados de espécimes cujos ductos se apresentavam opacos e enovelados foram destacados no gráfico, uma vez que esse aspecto pode estar relacionado à estocagem de esperma (SANTOS, 2009).

As análises do ciclo reprodutivo dos machos foram ainda completadas com análises histológicas dos testículos, ductos deferentes e rins, conforme descrito a seguir, na seção 3.2.3.

3.2.2 Ciclos reprodutivos das fêmeas

Na dissecação de cada fêmea adulta, foi anotado o comprimento do maior folículo ovariano observado, bem como o estágio de deposição de vitelo em que esse se encontrava – vitelogênese primária ou secundária. Para determinação do estágio de vitelogênese, foi observado o aspecto do folículo: aqueles de formato esférico, com coloração próxima do branco leitoso indicam vitelogênese primária, enquanto folículos em vitelogênese secundária apresentam-se com formato elipsóide e são amarelados (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002). Observou-se ainda a ocorrência de ovos nos ovidutos e, em caso positivo, todos tiveram medidos seu comprimento, altura e largura. Todas as medidas foram feitas utilizando-se paquímetro digital Digimess®, com precisão de 0,1 mm.

Os dados de comprimento do maior folículo ou ovo medido por fêmea, bem como de estágio de deposição de vitelo, foram utilizados para a construção de gráficos de dispersão tendo no eixo das abscissas as datas de coleta dos espécimes. A partir desses gráficos, foi possível estimar a duração e época das fases de crescimento folicular precedendo a ovulação, e de observação de ovos nos ovidutos.

Também nas fêmeas são medidos o comprimento e o diâmetro dos rins, possibilitando comparação com os resultados observados para os machos, como um grupo controle – já que o segmento sexual renal não hipertrofia nas fêmeas (FOX, 1977).

Foram ainda coletadas amostras dos ovidutos de uma parcela das fêmeas dissecadas, para a realização de análises histológicas, de acordo com o procedimento descrito a seguir, na seção 3.2.3.

3.2.3 Análises histológicas

De uma parcela dos espécimes dissecados, foram coletadas amostras para análise histológica, a qual permite uma caracterização mais segura e completa do ciclo reprodutivo. Os espécimes foram selecionados para amostragem visando abranger o maior número de meses do ano, esperando dessa forma ter representados nesse tipo de análise todas as fases do ciclo reprodutivo da espécie. Dos machos, foram coletadas amostras de testículo, ducto deferente e da porção anterior do rim. Nas fêmeas, foram retiradas amostras do rim e de três diferentes regiões do oviduto – oviduto posterior, oviduto médio ou útero, e a porção posterior do infundíbulo. Todas as amostras foram retiradas preferencialmente dos órgãos direitos, para que se preservasse íntegro um dos lados do aparelho urogenital e para padronização das amostras, exceto nos casos em que os órgãos esquerdos se encontravam melhor preservados.

Os materiais coletados foram processados para microscopia de luz, com inclusão em parafina. Para tanto, as peças foram desidratadas em uma série crescente de etanol de 70 a 100%, tratadas com xilol, impregnadas em parafina e então incluídas em blocos de parafina. Os blocos assim obtidos foram submetidos a cortes de 4 μm em micrótomo. Nos cortes resultantes foi então aplicada a coloração básica hematoxilina/eosina.

As lâminas produzidas a partir de testículos foram analisadas quanto ao estágio espermatogênico encontrado, tomando como base para a identificação das células do epitélio seminífero o trabalho de Volsøe (1944). Dessa forma, foi possível analisar o ciclo espermatogênico e as fases de recrudescência e repouso testicular ao longo do ano nas espécies estudadas. As lâminas produzidas a partir de ductos deferentes foram analisadas quanto à presença de espermatozóides, e os rins, quanto ao aspecto e à ocorrência de atividade secretora nos túbulos do segmento sexual renal.

As amostras de ovidutos foram analisadas quanto à sua anatomia e às variações morfológicas no endométrio ao longo do ciclo reprodutivo. As lâminas analisadas foram fotografadas por meio do software de captura de imagens Image-Pro Express Olympus®.

3.2.4 Análises comparativas de ciclo reprodutivo

Após as análises para caracterização dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas, as espécies amostradas foram comparadas entre si quanto à sazonalidade de seus ciclos reprodutivos, bem como quanto à duração e época das principais fases desses ciclos, que seja, espermiogênese, repouso reprodutivo, estocagem de esperma, crescimento folicular e ovulação. Tal comparação foi feita tendo como base a filogenia das Amphisbaenidae brasileiras, proposta por Mott e Vieites (2009), e que inclui dez das onze espécies de Amphisbaenidae aqui analisadas. *Blanus cinereus*, *B. mettetali* e *Trogonophis wiegmanni*, representantes das famílias Blanidae e Trogonophidae, foram considerados grupos externos para essa comparação, com base nas análises de Kearney e Stuart (2004), Macey et al. (2004), Vidal et al. (2007) e Mott e Vieites (2009).

As distribuições das localidades de coleta de espécies com ciclos sazonais e assazonais foram ainda sobrepostas a mapas de sazonalidade de precipitação e sazonalidade de temperatura, visando uma primeira aproximação em relação à influência de ciclos ambientais nos ritmos reprodutivos do grupo estudado. Para tanto, foi utilizado o banco de dados WorldClim, que interpola dados mensais médios de estações meteorológicas em uma resolução de 30 arcos de segundo (HIJMANS et al., 2005). Os dados de sazonalidade de precipitação e temperatura são calculados com base no desvio padrão das médias mensais dessas variáveis.

3.3 FECUNDIDADE

A fecundidade de cada espécie analisada foi inferida com base no número de ovos observados por fêmea grávida amostrada. Cada uma dessas fêmeas teve seus ovos medidos no comprimento, diâmetro e altura. No caso de espécies das quais foram amostradas mais de quatro fêmeas com ovos nos ovidutos, foram realizadas análises de regressão linear para verificar a existência de relação entre o número de ovos apresentado por cada fêmea e o comprimento rostro-cloacal desses espécimes. Ainda para essas espécies, foram realizadas análises de regressão entre o CRC e o volume total ocupado pelos ovos na cavidade abdominal da fêmea. Esse cálculo de volume foi feito por meio da fórmula do elipsóide ($V =$

$V = 4/3\pi \cdot r_1 \cdot r_2 \cdot r_3$, onde r_1 , r_2 e r_3 são os três raios do ovo). O peso dos ovos não foi medido para evitar a danificação dos ovidutos e dos próprios ovos, na remoção dos mesmos para pesagem.

3.4 DIMORFISMO SEXUAL

Machos e fêmeas de cada espécie foram comparados quanto às medidas de comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento caudal (CC), diâmetro do corpo (DC), e quanto à razão DC/CRC. Tal comparação foi feita por meio de ANOVA, para avaliação da ocorrência de dimorfismo sexual quanto a essas variáveis. Precedendo a análise de cada variável, os dados foram submetidos aos testes de Levene, para verificar a homogeneidade de variâncias dos dados, e de Shapiro-Wilk, para testar a normalidade da distribuição. Os conjuntos de dados que não satisfizeram esses pressupostos foram submetidos a transformação logarítmica para normalização, para só então serem submetidos a ANOVA. No caso de espécies com distribuição abrangendo mais de uma ecorregião ou bioma, os dados foram ainda separados de acordo com as localidades de origem dos espécimes, assim como foi feito para as análises de ciclo reprodutivo, a fim de se evitar distorções nas análises em função de possíveis diferenças entre populações.

4 RESULTADOS

4.1 CICLOS REPRODUTIVOS E HISTOLOGIA DAS VIAS GENITAIS

4.1.1 *Amphisbaena alba*

Foram amostrados no total 112 espécimes de *A. alba*, dos quais 91 (39 fêmeas e 52 machos) eram adultos, condição inferida a partir do aspecto dos ductos genitais, conforme a metodologia proposta. O menor macho adulto amostrado apresentava 327 mm de comprimento rostro-cloacal, e a menor fêmea adulta, 359 mm. Dentre os espécimes adultos, 4 fêmeas e 8 machos não puderam ser utilizados para análises de ciclo reprodutivo, devido a registros conflitantes ou indeterminação, nos livros-tombo das respectivas coleções zoológicas, das datas de coleta dos mesmos. Um macho não pôde ser aproveitado para as análises de ciclo pois seus testículos, ductos deferentes e rins haviam sido quase completamente removidos, restando apenas uma pequena porção posterior dos rins e ductos deferentes. Outro macho apresentava os órgãos mal preservados e muito frágeis e, apesar de ter sido possível confirmar seu sexo e estado de maturidade, não foram tomadas medidas de seus órgãos para evitar a danificação dos mesmos. Sendo assim, foram utilizados para análise do ciclo reprodutivo de *A. alba* os dados coletados de 35 fêmeas e 42 machos adultos. Os demais espécimes puderam, no entanto ser utilizados nas análises de dimorfismo sexual.

Os espécimes adultos amostrados foram coletados em 27 diferentes localidades, nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás e Distrito Federal. Observa-se, no mapa da figura 1, que essas localidades estão distribuídas em diferentes ecorregiões e biomas. Tendo em vista essa distribuição dos espécimes em regiões com características climáticas sazonais distintas, as análises de dados foram realizadas não somente com o conjunto amostral completo, mas também separando-se grupos de espécimes segundo as localidades de coleta, considerando as características climáticas gerais dessas regiões. Dessa forma, foram separados dos demais os espécimes coletados nas localidades inseridas nas ecorregiões de Florestas Costeiras da Serra do Mar e Floresta Atlântica do Alto Paraná, ambas do bioma Mata Atlântica, e que apresentam altos índices anuais de precipitação, estação seca de no máximo 3 meses, queda de temperaturas mínimas durante o inverno (NIMER, 1979).

Os dados dos espécimes desse grupo não foram analisados estatisticamente quanto a variações nas medidas de rins de machos e fêmeas, volume testicular e diâmetro dos ductos deferentes, devido ao seu baixo número amostral (8 fêmeas e 7 machos, com datas de coleta entre outubro e maio). Por isso, os dados dessa região foram utilizados apenas para construção de gráficos de dispersão daquelas medidas.

Em um outro grupo amostral foram incluídos os espécimes coletados em regiões de Cerrado (23 fêmeas e 29 machos) e aqueles provenientes de localidades inseridas na ecorregião de Matas Secas de Chiquitano (1 fêmea e 3 machos). Esses espécimes foram agrupados levando em conta que essas duas ecorregiões se assemelham quanto à sazonalidade climática, apresentando como característica uma estação seca bem marcada durante o inverno austral, e temperaturas médias mensais que nunca ficam abaixo de 18° (NIMER, 1979; AB'SÁBER, 2007). Por isso, para as análises estatísticas de variação das medidas de rins, volume testicular e diâmetro do ducto deferente ao longo do ano, esses dados foram divididos em estações seca (de abril a agosto) e chuvosa (de setembro a março), de acordo com as datas de coleta dos espécimes. Uma vez que a amostra completa de *A. alba* inclui também espécimes coletados em região de Mata Atlântica, tanto o grupo amostral que inclui espécimes de Cerrado e Chiquitano quanto o grupo com a amostra completa tiveram seus dados separados para análise de variação, alternativamente, em duas (seca e chuvosa) ou em quatro (verão, outono, inverno e primavera) estações, para facilitar a comparação entre os grupos.

Os dados de quatro espécimes coletados em localidades do Pantanal e do sul da Amazônia não foram analisados separadamente devido ao seu baixo número amostral (apenas dois machos e duas fêmeas das localidades no sul da Amazônia, e um macho e uma fêmea de uma localidade inserida no Pantanal). No entanto, esses dados foram incluídos na análise do conjunto completo de dados.

Figura 1 – Localidades de coleta dos espécimes adultos de *Amphisbaena alba* amostrados, mostrando sua distribuição nos biomas (à esquerda) e ecorregiões (à direita) brasileiros

Fonte: SANTOS, L. C., 2013.

Entre as fêmeas de *A. alba* do Cerrado e Matas Secas de Chiquitano, a principal dificuldade de amostragem se deu entre os meses de maio e dezembro. A escassez de dados desse período fica evidente no gráfico de dispersão dos valores de comprimento do maior folículo ou ovo medido em cada fêmea, segundo as datas de coleta dos espécimes (Figura 2). Por outro lado, observa-se nesse mesmo gráfico que entre as 21 fêmeas amostradas nos seis primeiros meses do ano, nenhuma apresentava folículos de comprimento superior a 10 mm. Já na amostragem do segundo semestre, de apenas três fêmeas, uma (UFMT 3312) apresentava 5 ovos nos ovidutos, com comprimento médio 36,26mm ($\pm 2,335$). Esse quadro sugere, para as fêmeas dessa espécie, reprodução sazonal. A fase de maior crescimento folicular teria lugar, possivelmente, entre maio (quando ainda são observados folículos de até 10 mm) e outubro (quando se registrou uma fêmea com ovos), portanto, durante a estação seca e início da estação chuvosa. A observação de fêmeas em vitelogênese primária em agosto e outubro, próximo à época em que foi amostrada uma fêmea com ovos, sugere um ciclo bienal ou de período superior para as fêmeas da espécie.

Figura 2 – Comprimento do maior folículo ou ovo observado em cada fêmea adulta de *Amphisbaena alba* de localidades de Cerrado, segundo as datas de coleta dos espécimes

Apenas 8 fêmeas adultas de *A. alba* foram amostradas nas localidades inseridas em região de Mata Atlântica. Dessas, nenhuma apresentava ovos nos ovidutos, mas um espécime coletado em outubro tinha folículos ovarianos em estágio avançado de vitelogênese

secundária (ZUEC 225), como se nota no gráfico de dispersão da figura 3. Esse espécime, com o mesmo mês de coleta da fêmea com ovos amostrada no Cerrado, apresentava 11 folículos com comprimentos variando entre 26,39 mm e 30,77 mm. Essas medidas são próximas às dos ovos observados na fêmea do centro oeste, que variaram entre 33,26 mm e 39,57 mm. Assim, é possível que a fêmea do sudeste estivesse próxima à fase de ovulação, que seria semelhante àquela observada no centro-oeste.

Figura 3 – Comprimento do maior folículo ou ovo observado em cada fêmea adulta de *Amphisbaena alba* de localidades da região de Mata Atlântica, segundo as datas de coleta das mesmas

As três fêmeas amostradas em localidades do Pantanal e sul da Amazônia foram coletadas em março, maio e junho e apresentavam folículos com comprimentos de no máximo 5 mm. Assim, a partir da amostragem que se obteve neste estudo, não foi possível verificar diferenças no ciclo reprodutivo de fêmeas de *A. alba* de diferentes ecorregiões. O gráfico de dispersão da figura 4 mostra o conjunto total de dados de comprimento do maior folículo ou ovo observado em cada fêmea, segundo suas datas de coleta.

Figura 4 – Comprimento do maior folículo ou ovo observado em cada fêmea adulta de *Amphisbaena alba*, segundo as datas de coleta das mesmas, considerando a totalidade da amostra

Puderam ser coletadas amostras de ovidutos de 28 fêmeas para análises histológicas e observação de variações morfológicas nesses órgãos nas diferentes fases do ciclo reprodutivo. Dessas, 18 fêmeas são provenientes de regiões de Cerrado, 1 de Matas Secas de Chiquitano, 7 de Mata Atlântica e 2 do sul da Amazônia. No entanto, como exposto acima, a maioria das fêmeas examinadas se encontrava em vitelogênese primária ou início da vitelogênese secundária, com folículos de até 10 mm, tendo sido observada apenas uma fêmea com ovos e uma em fase avançada de deposição de vitelo. Ainda assim, puderam ser observadas diferenças morfológicas entre os ovidutos das fêmeas em vitelogênese primária ou início da vitelogênese secundária e os da fêmea em uma fase avançada da vitelogênese secundária (ZUEC 225). As primeiras apresentam ovidutos com epitélio simples cúbico, de núcleo central, e mucosa com poucas dobras, pouco profundas, tanto na porção média quanto na porção posterior do oviduto (Figuras 5A e 5C). Em algumas dessas fêmeas foi possível observar glândulas de origem epitelial, mais ou menos conspícuas e ainda sem atividade secretora, na camada conjuntiva da mucosa (Figuras 5A e 5B). Já a fêmea em vitelogênese secundária apresentou, na porção posterior do oviduto, endométrio com muitas dobras e epitélio colunar, e algumas células soltas na luz do ducto (Figura 5D). Na porção média do oviduto, os tecidos dessa fêmea apresentavam-se menos conservados, de modo que a camada conjuntiva da mucosa se apresentava desestruturada, sendo por isso difícil a observação das glândulas uterinas nesse espécime. Houve também dificuldade na observação histológica dos ovidutos da fêmea com ovos. Naquele espécime, os ductos apresentavam-se bastante distendidos, e a mucosa não se encontrava bem preservada. No entanto, foi possível observar

uma camada de secreção, provavelmente originada nas glândulas uterinas, entre o epitélio do endométrio e as fibras da casca de um dos ovos.

Figura 5 – Cortes histológicos de ovidutos de *Amphisbaena alba*

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. oviduto médio de fêmea coletada em abril, com folículos de até 5,76 mm, mostrando pequenas glândulas no endométrio (CHUNB 49681); B. oviduto médio de fêmea coletada em março, com folículos de até 5,5 mm, e com glândulas uterinas mais evidentes (CHUNB 440); C. oviduto posterior de espécime coletado em janeiro, com epitélio cúbico e dobras pouco profundas no endométrio (CHUNB 44138); D. oviduto posterior de fêmea coletada em outubro, com folículos de até 30,77, mostrando dobras profundas no endométrio e epitélio colunar (ZUEC 225). Ep: epitélio; lp: lâmina própria; gl: glândula. Coloração: hematoxilina/eosina.

Precedendo as análises de variação ao longo do ano das medidas de volume testicular, diâmetro do ducto deferente, e comprimento e diâmetro dos rins, cada uma dessas variáveis foi submetida a análise de regressão linear, tendo como variável independente o comprimento rostro-cloacal (CRC) dos espécimes. Todas as variáveis apresentaram relação significativa com o CRC, seja considerando apenas os dados de espécimes de áreas de Cerrado e Chiquitano, seja incluindo a amostra completa. Tendo em vista esse resultado, a variação das medidas mencionadas entre as estações do ano foi analisada por meio de ANCOVA, tendo como co-variável o CRC. Da mesma forma, os gráficos de dispersão foram construídos com base nos resíduos da referida regressão linear.

Ainda precedendo as análises de variância, os dados foram testados quanto à homocedasticidade (por meio do teste de Levene) e à normalidade (utilizando o teste de Shapiro-Wilk). As medidas de volume testicular da amostra das regiões de Cerrado e Chiquitano não apresentaram distribuição normal, segundo teste de Shapiro-Wilk ($p = 0,019$), e por isso foram submetidas a transformação logarítmica ($\ln$), resultando então em uma distribuição compatível com a hipótese de normalidade ($p = 0,758$). No entanto, essa distribuição não apresentou variâncias homogêneas, mesmo quando transformada, motivo pelo qual o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis também foi observado para inferir a existência de variação nos volumes testiculares desse grupo amostral ao longo do ano. Tal variação não foi verificada, tanto com o teste de Kruskal-Wallis quanto com ANCOVA, e separando-se os dados em quatro (verão, outono, inverno e primavera) ou em duas (seca e chuvosa) estações.

Os índices estatísticos resultantes das análises de regressão linear e de comparação de médias das variáveis entre as estações do ano, bem como o número de espécimes coletados em cada estação do ano, por grupo amostral, estão resumidos na tabela 2.

Tabela 2 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de comparação de médias das variáveis obtidas de machos de *Amphisbaena alba*

Grupo amostral	Variável	N	Regressão linear		Estações: verão/outono/inverno/primavera				Estações: seca/chuvosa			
					N (por estações)	ANCOVA		K-W	N (por estações)	ANCOVA		K-W
			p	R ²		p	F	p		p	F	p
Cerrado / Chiquitano	Volume testicular	21	0,001	0,469	9 / 7 / 3 / 2	0,05*	3,25*	0,465**	9 / 12	0,51*	0,453*	0,356
	Diâmetro do ducto deferente	32	0,002	0,283	14/13/3/2	0,206	1,63	0,205	15 / 17	0,288	1,17	0,093
	Comprimento do rim	31	<0,001	0,790	14/12/3/2	0,887	0,213	0,189	14 / 17	0,506	0,454	0,032
	Diâmetro do rim	32	0,003	0,256	14/13/3/2	0,07	2,639	0,142	15 / 17	0,673	0,182	0,355
Amostra total	Volume testicular	31	<0,001	0,484	16/8/3/4	0,477*	0,855*	0,752	10 / 21	0,294*	1,146*	0,272
	Diâmetro do ducto deferente	41	<0,001	0,267	20/14/3/4	0,062	2,674	0,063	16 / 25	0,138	2,301	0,022
	Comprimento do rim	41	<0,001	0,720	21/13/3/4	0,726	0,439	0,065	15 / 26	0,403	0,716	0,010
	Diâmetro do rim	42	0,036	0,105	21/14/3/4	0,495*	0,812*	0,279	16 / 26	0,801*	0,064*	0,338

K-W: teste de Kruskal-Wallis.

Os índices p considerados significativos ($p < 0,05$) estão em negrito.

*A variável não tem distribuição normal, e por isso foram usados para análise os dados submetidos a transformação logarítmica (ln).

** A amostra não apresenta distribuição homogênea das variâncias, e por isso o teste de Kruskal-Wallis é mais confiável para a análise de variação das médias.

Ao se considerar a amostra completa de machos, a distribuição dos dados de volume testicular também não se adequou à hipótese de normalidade ($p = 0,049$) mas, assim como os dados da amostra do Cerrado, apresentou distribuição normal após transformação logarítmica ($p = 0,419$). Essa amostra tem variâncias homogêneas ($p = 0,202$), o que permitiu a utilização de testes paramétricos tendo como base os dados transformados para inferir variações no volume testicular entre as estações do ano. Da mesma forma como observado para a amostra do Cerrado, a amostra completa não apresentou variação significativa ao longo do ano nos volumes testiculares, tanto ao se agrupar os dados em estações seca e chuvosa, quanto ao se considerar as quatro estações. As figuras 6 e 7 mostram os gráficos de dispersão dos resíduos resultantes da análise de regressão linear entre os valores de volume testicular e CRC, na amostra do Cerrado e na amostra completa. Nesses gráficos, bem como nos diagramas boxplot que separam os dados da amostra completa por estações (Figuras 8 e 9), não ficam evidentes variações dessas medidas ao longo do ano.

Figura 6 – Gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear entre os dados de volume testicular e comprimento rostro-cloacal em *Amphisbaena alba* adultos, das regiões de Cerrado e Matas Secas de Chiquitano

Figura 7 – Gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear entre os dados de volume testicular e comprimento rostro-cloacal em *Amphisbaena alba* adultos, considerando a amostra completa

Figura 8 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular da amostra completa de machos adultos de *Amphisbaena alba*, organizados em quatro estações do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 9 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular da amostra completa de machos adultos de *Amphisbaena alba*, separados entre estações seca e chuvosa, segundo as datas de coleta dos espécimes

Os gráficos de dispersão das medidas de diâmetro do ducto deferente também não mostram grande variação desses dados ao longo do ano, considerando-se tanto a amostra completa quanto apenas os espécimes de Cerrado e Chiquitano, exceto por um valor mais elevado em agosto e por medidas ligeiramente menores entre abril e junho (Figuras 10 e 11). Ainda nesses gráficos, nota-se que foram observados machos com ductos deferentes enovelados em quase todos os meses amostrados, à exceção de novembro e dezembro.

Em ambos os grupos amostrais, as medidas de diâmetro do ducto deferente apresentaram distribuições normais e com variâncias homogêneas, e não foram observadas diferenças significativas entre as médias desses valores por estação do ano, segundo ANCOVA. No caso da amostra completa, no entanto, o teste de Kruskal-Wallis aponta a ocorrência de diferença significativa entre as médias obtidas nas estações seca e chuvosa. O diagrama boxplot dos dados desse grupo amostral aponta a ocorrência de menores valores de diâmetro dos ductos durante a estação seca (de abril a agosto) (Figura 12), provavelmente refletindo os valores mais baixos observados entre abril e junho.

Figura 10 – Gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear entre comprimento rostro-cloacal e diâmetro do ducto deferente de *Amphisbaena alba*, de espécimes coletados em regiões de Cerrado e Matas Secas de Chiquitano

Figura 11 – Gráficos de dispersão dos resíduos da regressão linear entre comprimento rostro-cloacal e diâmetro do ducto deferente de *Amphisbaena alba*, na totalidade de espécimes adultos amostrados

Figura 12 – Diagrama boxplot dos dados de diâmetro do ducto deferente distal da amostra completa de adultos de *Amphisbaena alba*, separados entre as estações seca e chuvosa, segundo as datas de coleta dos espécimes

Os dados de comprimento dos rins apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas, nos dois grupos amostrais considerados. O mesmo foi observado para as medidas de diâmetro dos rins, na amostra de espécimes de Cerrado e Chiquitano. No entanto, na amostragem geral, as medidas de diâmetro apresentaram distribuição não normal ($p = 0,041$), o que se regularizou quando utilizada transformação logarítmica dos dados ($p = 0,800$). Por isso, para as análises de diferença de médias dessa variável, utilizaram-se os dados log-transformados.

Nos dois grupos amostrais testados, as análises de ANCOVA não mostraram variação significativa entre as médias das estações seca e chuvosa, ou entre verão, outono, inverno e primavera, tanto para as medidas de comprimento como para as de diâmetro dos rins. Entretanto, uma diferença significativa entre as médias de comprimento dos rins das estações seca e chuvosa foi apontada pelo teste de Kruskal-Wallis, tanto na amostra total quanto para os espécimes de Cerrado e Chiquitano. No entanto, ao olhar para os gráficos de dispersão desses dados, não é possível notar um padrão claro de aumento e diminuição desses valores ao longo do ano, sendo que apenas alguns valores se destacam em fevereiro e em junho (Figuras 13 e 14). Como ilustra o diagrama boxplot da figura 15, que diferente dos gráficos de dispersão acima mencionados não elimina o efeito do CRC sobre os dados em questão, as medidas de comprimento do rim são maiores durante a estação chuvosa.

Figura 13 – Gráfico de dispersão dos resíduos resultantes da análise de regressão linear entre comprimento do rim e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de *Amphisabena alba* das ecorregiões de Cerrado e Matas de Chiquitano

Figura 14 – Gráficos de dispersão dos resíduos resultantes da análise de regressão linear entre comprimento do rim e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de *Amphisbaena alba* (amostra completa)

Figura 15 – Diagramas boxplot dos dados de comprimento do rim direito, da amostra completa de machos adultos de *Amphisbaena alba*, separados entre as estações seca e chuvosa

As medidas de diâmetro dos rins, diferente do comprimento desses órgãos, não apresentaram qualquer diferença significativa entre as estações seca e chuvosa, tampouco entre verão, outono, inverno e primavera. Esse mesmo resultado foi obtido tanto com ANCOVA quanto com teste de Kruskal-Wallis. Embora nenhuma variação significativa tenha sido observada, o diagrama boxplot dos dados de diâmetro do rim mostra um aumento nesses valores na primavera (do final de setembro ao final de dezembro) (Figura 16). O mesmo não se observa quando se dividem os dados em estações seca e chuvosa (Figura 17). No entanto, devemos considerar que o número amostral da primavera ($N = 4$) é muito mais baixo do que aqueles do verão e outono ($N = 21$ e $N = 14$, respectivamente). Esse baixo número amostral (evidente no gráfico de dispersão da Figura 18) e o grande CRC dos espécimes coletados na primavera (variando entre 468 e 573 mm) podem ter influenciado nessa elevação dos valores no boxplot.

Figura 16 – Diagramas boxplot dos dados de diâmetro do rim de *Amphisbaena alba* machos, divididos segundo a estação do ano em que os espécimes foram coletados, considerando-se quatro estações do ano

Figura 17 – Diagramas boxplot dos dados de diâmetro do rim de *Amphisbaena alba* machos, divididos segundo a estação do ano em que os espécimes foram coletados, considerando-se duas estações do ano

Figura 18 – Gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear entre comprimento rostro-cloacal e diâmetro do rim de *Amphisbaena alba* machos

Foram obtidas amostras para processamento histológico de testículos, ductos deferentes e rins de 38 machos adultos, com datas de coleta distribuídas ao longo de todos os meses do ano, exceto setembro. As amostras foram coletadas de 27 espécimes de localidades em regiões de Cerrado, 3 de Matas Secas de Chiquitano, além de 6 espécimes de Mata Atlântica e 2 do sul da Amazônia. Por meio das análises histológicas de testículos foi possível observar, para machos de regiões de Cerrado e Matas Secas de Chiquitano, em todos os meses amostrados, a ocorrência de espécimes em espermiogênese, e com espermatozóides nos ductos deferentes, misturados a gotículas de secreção (Figuras 19A e B). Por outro lado, foram observados também alguns machos com testículos em repouso, apresentando somente espermatogônias nos túbulos seminíferos, em uma regressão acentuada desse epitélio, e ausência de espermatozóides nos ductos deferentes (Figura 19C), sempre em meses nos quais foram também observados dois ou mais espécimes com o epitélio seminífero completamente desenvolvido.

O registro de espécimes espermiogênicos ou em repouso reprodutivo em um mesmo mês também foi observado entre os machos de localidades inseridas em região de Mata Atlântica. Desse bioma, no mês de fevereiro, foram amostrados dois machos em fase espermiogênica, com espermatozóides nos ductos deferentes, e um terceiro com o epitélio seminífero desenvolvido até espermatócitos, e com ductos deferentes vazios. Um outro espécime coletado em dezembro também tinha os ductos vazios e o epitélio seminífero desenvolvido até espermatócitos, mas em alguns túbulos seminíferos, esse espécime

apresentava alguns espermatozóides se diferenciando junto à luz dos túbulos seminíferos. Esse aspecto, juntamente com a não observação de espermatozóides nos ductos deferentes, sugere que esses dois indivíduos poderiam estar no início de uma nova fase espermiogênica. Outros dois espécimes de Mata Atlântica, coletados em outubro e novembro, se encontravam espermiogênicos e com espermatozóides nos ductos deferentes. A observação de machos produzindo espermatozóides ao longo de todo o ano, ao mesmo tempo em que se observam alguns machos em outras fases de desenvolvimento do epitélio seminífero ou em repouso reprodutivo sugere, por um lado, a assazonalidade reprodutiva nas populações de machos de *A. alba*, e por outro lado a ocorrência de uma fase de repouso reprodutivo não sincrônica entre os indivíduos. A assazonalidade que se verifica ao considerarmos o conjunto dos indivíduos justifica a não observação de variações significativas nas medidas de volume testicular e diâmetro do ducto deferente, e contrasta com a sazonalidade sugerida pelos dados de ciclo reprodutivo das fêmeas. Os dois únicos espécimes do sul da Amazônia amostrados foram coletados em março, e apresentavam o epitélio seminífero completamente desenvolvido, e presença de espermatozóides e gotículas de secreção nos ductos deferentes.

Variações no segmento sexual renal também foram observadas por meio de microscopia de luz e são indicativas da existência de uma fase de repouso reprodutivo nos indivíduos. Todos os machos amostrados que se encontravam espermiogênicos e com espermatozóides nos ductos deferentes apresentavam os túbulos do segmento sexual renal secretores, e com diâmetro visivelmente maior do que os túbulos adjacentes (Figura 19D). As células do epitélio desses túbulos têm, nessa fase, núcleo basal e sua porção apical repleta de grânulos de secreção (Figura 19E). Naqueles machos que mostraram apenas espermatogônias nos túbulos seminíferos, ou o epitélio seminífero desenvolvido até a fase de espermatócitos, ou mesmo no início da fase espermiogênica, não se observou produção de secreção nos túbulos do SSR, e esses se apresentaram com diâmetros semelhantes aos túbulos adjacentes (Figura 19F). As fêmeas também tiveram amostras do rim coletadas para análise, para comparação com as amostras de machos, e em todos os espécimes analisados os túbulos néfricos tinham diâmetros uniformes e não apresentavam aspecto secretor.

Tendo em vista o acima exposto, não se observaram, a partir dos dados obtidos, diferenças de ciclo reprodutivo entre os espécimes amostrados em diferentes ecorregiões. O quadro 1 resume as características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *A. alba*, que puderam ser inferidas a partir dos dados macroscópicos e histológicos apresentados acima.

Figura 19 – Cortes histológicos de machos adultos de *Amphisbaena alba*

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. testículo em fase espermiogênica, de macho coletado em junho (UFMT 4763); B. ducto deferente apresentando espermatozoides em meio a gotículas de secreção, de macho coletado em agosto (UFMT 5424); C. testículo de espécime coletado em agosto, mostrando apenas espermatogônias nos túbulos seminíferos (CHUNB 38202); D. rim de macho coletado em março, mostrando os túbulos do segmento sexual renal aumentados e secretores (à direita), ao lado de túbulos néfricos da região adjacente (à esquerda) (CHUNB 35650); E. túbulos do segmento sexual renal do mesmo macho da figura D, em maior aumento; F. corte de rim e ducto deferente de macho coletado em dezembro, apresentando túbulos do segmento sexual renal em fase não secretora, e ausência de espermatozoides no ducto deferente (CRIB 584). dd: ducto deferente; ept: epitélio do ducto deferente. Coloração: hematoxilina/eosina.

Quadro 1– Resumo das características dos ciclo reprodutivos de machos e fêmeas de *Amphisbaena alba*

Sazonalidade do ciclo reprodutivo	Machos	Assazonal, com fases de repouso não sincrônicas entre os indivíduos
	Fêmeas	Sazonal, com ovulação no início da estação chuvosa
Espermio gênese		Ao longo de todo o ano
Espermatozoides nos ductos deferentes		Ao longo de todo o ano
Segmento sexual renal		Ao longo de todo o ano
Crescimento folicular		Possivelmente entre julho e outubro (estação seca e início da estação chuvosa / inverno e primavera)
Ovos		Outubro (estação chuvosa / primavera)

4.1.2 *Amphisbaena anomala*

Foram amostrados no total 46 espécimes de *Amphisbaena anomala*, sendo 23 fêmeas e 23 machos. Dentre esses, 19 fêmeas e todos os 23 machos eram adultos e puderam ser utilizados nas análises de ciclo reprodutivo. O menor macho adulto amostrado apresentava 232 mm de comprimento rostro-cloacal, e a menor fêmea adulta, 242 mm. Os espécimes provieram de 15 diferentes localidades, nos estados do Pará e Maranhão, todas inseridas no bioma da Amazônia (Figura 20). Podemos notar ainda, na figura 20, que a maioria dessas localidades se encontra na ecorregião do Interflúvio do Tocantins-Araguaia/Maranhão, que possui clima equatorial, quente e úmido. Naquela região, segundo Ab'Sáber (2007), inexistia estação seca. Apenas um espécime amostrado proveio de uma ecorregião diferente, as Florestas de Babaçu do Maranhão (MPEG 11760, fêmea coletada em Puraquêu, MA). Segundo o mapa de climas do Brasil de Nimer (1979), essa localidade está em área de clima tropical equatorial quente e semi-úmido, com quatro a cinco meses secos. As Florestas de Babaçu do Maranhão encontram as Florestas Úmidas do Interflúvio do Tocantins-Araguaia a oeste, a Caatinga a leste, e o Cerrado ao sul, e se caracterizam por um mosaico de vegetação. (AB'SÁBER, 1966). Dado que apenas um espécime foi coletado nessa ecorregião, em localidade próxima ao Interflúvio do Tocantins-Araguaia, o mesmo foi mantido na amostra e analisado juntamente com os demais.

A ausência de uma estação seca bem marcada na região amostrada impôs uma dificuldade para a análise de variação, ao longo do ano, das medidas utilizadas para caracterização do ciclo reprodutivo. Para a realização de tais análises é preciso dividir a amostra em níveis do fator, mas não se pode dividir as datas de coleta dos espécimes dessa região em estações seca e chuvosa, ou em primavera, verão, outono e inverno. A divisão dos dados por meses de coleta também não é interessante nesse caso, já que o número amostral obtido por mês seria muito baixo, variando de zero a quatro tanto para machos quanto para fêmeas. Por isso, optou-se por realizar a divisão dos dados em quatro estações do ano, apenas para que se pudesse inferir a ocorrência de variação nas medidas analisadas ao longo do ano, e para facilitar a comparação com as outras espécies analisadas.

Figura 20 – Distribuição das localidades de coleta dos espécimes de *Amphisbaena anomala* adultos amostrados, nos biomas e ecorregiões brasileiros (à esquerda e à direita, respectivamente)

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

Os dados de comprimento folicular obtidos nas disseções não forneceram informações suficientes para caracterizar o ciclo reprodutivo de fêmeas de *A. anomala*. Como se pode observar no gráfico de dispersão desses dados, a fêmea com os maiores folículos observados foi coletada em fevereiro (Figura 21), e o comprimento dos mesmos alcançou até 16,18 mm. Não há dados na literatura a respeito de ovos de *A. anomala*, e por isso não é possível estimar o quão próxima essa fêmea estaria da ovulação. Ao mesmo tempo, não foram amostradas fêmeas com ovos nos ovidutos, não sendo possível, a partir desses dados, inferir a época em que ocorre a ovulação nessa espécie.

Figura 21 – Gráfico de dispersão dos valores de comprimento do maior folículo medido em cada fêmea adulta de *Amphisbaena anomala*

Por meio de análises histológicas, observou-se que o oviduto dessa espécie apresenta epitélio simples e cúbico, com lâmina própria de tecido conjuntivo. Na porção distal do oviduto, ocorrem pequenas dobras nesse endométrio, e não foram observadas glândulas. Por outro lado, na porção média do oviduto, há glândulas inseridas na lâmina própria conjuntiva do endométrio (Figura 22). Não foram observadas grandes variações no aspecto dos ovidutos entre os espécimes, provavelmente por não terem sido amostradas fêmeas em fase próxima à ovulação.

Figura 22 – Cortes histológicos do oviduto de *Amphisbaena anomala*.

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. porção posterior do oviduto de fêmea coletada em maio (MPEG 6522); B. oviduto médio de fêmea coletada em dezembro (MPEG 22142). Coloração: hematoxilina/eosina.

As valores de soma dos volumes dos testículos, comprimento e diâmetro dos rins e diâmetro do ducto deferente foram submetidos a análise de regressão linear com o CRC, para posterior análise de variação dessas medidas ao longo do ano. Como apontam os valores p resumidos na tabela 3, apenas o comprimento do rim tem relação significativa com o comprimento rostro-cloacal em *A. anomala*, e por isso utilizou-se ANCOVA para avaliar a ocorrência de variação desses valores ao longo do ano, tendo como co-variável o CRC. As demais variáveis foram analisadas por meio de ANOVA.

Essas variáveis foram ainda submetidas ao teste de Shapiro-Wilk, que apontou uma distribuição não normal apenas para os valores de volume testicular ($p = 0,001$). Essa medida foi, então, submetida a transformação logarítmica, resultando numa distribuição adequada à hipótese de normalidade ($p = 0,332$). Todas as demais variáveis foram consideradas normais segundo Shapiro-Wilk. O pressuposto da homogeneidade de variâncias, testado por meio do teste de Levene, foi satisfeito por todas as variáveis. Além dos testes de ANOVA e ANCOVA, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis também foi utilizado para inferir a ocorrência de variação entre as médias das variáveis por estação do ano. Os resultados dos testes de ANOVA, ANCOVA e Kruskal-Wallis obtidos são mostrados a seguir, e estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de *Amphisbaena anomala*

Variável	N	Regressão linear		N (por estações)	ANOVA/ANCOVA		K-W
		p	R ²		p	F	
Volume testicular	23	0,605	0,013	9 / 5 / 5 / 4	0,340*	1,192*	0,295
Diâmetro do ducto deferente	23	0,945	< 0,001	9 / 5 / 5 / 4	0,031	3,646	0,026
Comprimento do rim	23	0,002	0,386	9 / 5 / 5 / 4	0,872	0,234	0,816
Diâmetro do rim	23	0,743	0,005	9 / 5 / 5 / 4	0,011	4,925	0,026

K-W: teste de Kruskal-Wallis.

Os índices p considerados significativos ($p < 0,05$) estão em negrito.

*A variável não tem distribuição normal, e por isso foram usados para análise os dados submetidos a transformação logarítmica (ln).

O gráfico de dispersão dos valores de volume testicular dos machos adultos de *A. anomala* mostra apenas um valor destacado dos demais (correspondente ao espécime MPEG 11988), em outubro, sem no entanto evidenciar variações nessa medida entre os demais indivíduos ao longo do ano (Figura 23). Esse valor mais elevado em outubro se reflete no boxplot dos dados de volume testicular separados por estação do ano (Figura 24). Nesse diagrama notam-se valores menores no outono e maiores na primavera (estação na qual está incluso o valor destacado de outubro). Apesar dessa diferença, o teste de ANOVA não apontou variação significativa de volume testicular entre as médias das estações ($p = 0,340$).

Figura 23 – Gráfico de dispersão dos valores de soma dos volumes dos testículos direito e esquerdo de *Amphisbaena anomala* adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 24 – Diagrama boxplot dos valores de soma dos volumes dos testículos direito e esquerdo de *Amphisbaena anomala* adultos, agrupados em estações do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes

Os dados de diâmetro dos ductos deferentes, por outro lado, apresentaram variação significativa durante o ano, segundo ANOVA ($p = 0,031$) e Kruskal-Wallis ($p = 0,026$). Os testes post-hoc de Tukey e Games-Howell apontaram diferença significativa entre as médias

do verão e do outono. De fato, no gráfico de dispersão desses valores (Figura 25) notam-se medidas menores nos meses de maio, junho e julho – os dois primeiros incluídos no outono, e o último incluído no inverno. O diagrama boxplot desses dados também evidencia o registro de menores valores no outono (Figura 26). É necessário notar, também no gráfico de dispersão da figura 25, que os maiores valores de diâmetro foram registrados quando os ductos deferentes estavam enovelados, à exceção de um ponto em dezembro. Assim, os o registro de menores valores de diâmetro entre maio e julho pode estar relacionado ao fato de não terem sido amostrados espécimes com ductos enovelados nesse período. Pode-se notar ainda, no gráfico de dispersão da figura 25, que só foram observados ductos deferentes enovelados nos meses de fevereiro, março, setembro e outubro. Nesses mesmos meses, no entanto, foram também amostrados espécimes que não apresentavam esse enovelamento.

Figura 25 – Gráfico de dispersão dos valores de diâmetro do ducto deferente distal de *Amphisbaena anomala* adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 26 – Diagrama boxplot dos dados de diâmetro do ducto deferente de *Amphisbaena anomala* separados por estações do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes

As medidas de comprimento e diâmetro dos rins tiveram seus maiores valores registrados no segundo semestre, como se observa nos gráficos de dispersão das figuras 27 e 28. Os diagramas boxplot desses dados agrupados em quatro estações do ano, no entanto, sugerem variação somente nas médias de diâmetro dos rins ao longo do ano, com os maiores valores registrados no inverno, ou seja, entre 22 de junho e 21 de setembro (Figuras 29 e 30). De fato, a análise de ANCOVA não aponta diferença significativa entre as médias de comprimento do rim entre as estações ($p = 0,872$), ao passo que o diâmetro do órgão varia significativamente ao longo do ano segundo ANOVA ($p = 0,011$). Os teste post-hoc de Tukey indica que a média dessa última variável no inverno é significativamente maior do que a média obtida no outono, enquanto Games-Howell aponta diferença significativa entre os valores observados no inverno e aqueles registrados no outono e também no verão.

Figura 27 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre comprimento do rim e comprimento rostro-cloacal de *Amphisbaena anomala* adultos

Figura 28 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do rim e comprimento rostro-cloacal de *Amphisbaena anomala* adultos

Figura 29 – Diagrama boxplot dos dados de comprimento dos rins de *Amphisbaena anomala*, separados por estação do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 30 – Diagrama boxplot dos dados de diâmetro dos rins de *Amphisbaena anomala*, separados por estação do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes

Obtiveram-se amostras histológicas de testículos, ductos deferentes e rins de 15 machos coletados em nove diferentes meses do ano, não tendo sido amostrados espécimes de abril, agosto e novembro. Por meio das análises histológicas dos testículos observaram-se 8 machos em fase de repouso testicular, com acentuada regressão do epitélio seminífero, que nesses espécimes apresenta espermatogônias, e tecido intersticial espesso (Figura 31A). Esses espécimes foram amostrados em janeiro, fevereiro, março, junho, julho e dezembro. Desses, dois machos coletados em fevereiro e dezembro (MPEG 12716 e MPEG 22138) tinham espermatozóides nos ductos deferentes, indicando terem passado por uma fase reprodutiva recente (Figura 31B). Os demais machos com testículos em repouso não tinham espermatozóides nos ductos (Figura 31F).

Foram observados ainda machos em fase espermiogênica, com o epitélio seminífero completamente desenvolvido, coletados nos meses de fevereiro, março, julho, setembro e outubro (Figura 31C). A maioria desses espécimes apresentava espermatozóides nos ductos deferentes, à exceção dos espécimes MPEG 6507, de julho, e MPEG 6523, de maio. Esses indivíduos se encontravam no início de sua fase espermiogênica, sendo possível observar os espermatozóides em formação já com seu núcleo alongado, mas ainda sem a cauda formada e antes da eliminação da maior parte do citoplasma (Figura 31D).

O fato de espécimes espermiogênicos e em repouso testicular terem sido observados de maneira bem distribuída ao longo do ano, e inclusive nos mesmos meses, sugere assazonalidade reprodutiva do ponto de vista da população, para *A. anomala*, e está possivelmente relacionado à não ocorrência de variação significativa nos dados de volume testicular, como mostrado acima. Ao mesmo tempo, o registro de oito machos em repouso reprodutivo (entre quinze amostrados para análise histológica) aponta para uma sazonalidade reprodutiva dos indivíduos, com uma fase de repouso bem distinta. Essa fase de repouso não ocorre, portanto, em sincronia para todos os indivíduos da população.

Se por um lado não se observou variação nos volumes testiculares ao longo do ano, por outro lado a comparação de médias de diâmetro dos rins entre as estações mostrou um aumento significativo nesses valores no segundo semestre do ano, sugerindo variação sazonal dessa medida na população. Esse aumento está possivelmente atrelado a um ciclo de atividade do segmento sexual renal. Por meio das análises histológicas, observou-se que o SSR se encontrava secretor em todos os espécimes que apresentavam espermatozóides já formados em seus túbulos seminíferos. Nessa fase, as células dos túbulos do segmento sexual renal assumem morfologia colunar, seu núcleo tem posição basal, e a parte apical das células se apresenta repleta de gotículas de secreção (Figura 31E). Não foi observada atividade secretora

do SSR nos espécimes em repouso reprodutivo, ou mesmo nos espécimes já em fase espermiogênica, mas ainda sem espermatozóides completamente diferenciados (Figura 31F). No entanto, isso não explica o aumento no diâmetro dos rins no segundo semestre, já que os espécimes espermiogênicos foram amostrados também em fevereiro e março. É possível, no entanto, que esse aumento esteja associado a uma fase de atividade mais intensa do segmento sexual renal, o que poderia indicar a época de cópula nessa espécie.

Todas as fêmeas amostradas para análises histológicas apresentavam rins com túbulos não secretores. Também não foram observadas variações significativas no comprimento ou no diâmetro dos rins das fêmeas da espécie, segundo ANOVA ($p = 0,643$ e $p = 0,849$, respectivamente).

As características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *A. anomala*, inferidas a partir dos dados acima apresentados, estão sumarizadas no quadro 2.

Quadro 2 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *Amphisbaena anomala*, inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos

Sazonalidade do ciclo reprodutivo	Machos	Assazonal, com fases de repouso acentuado não sincrônicas entre os indivíduos
	Fêmeas	Não foram obtidas informações suficientes
Espermiogênese		Ao longo de todo o ano
Espermatozóides nos ductos deferentes		Ao longo de todo o ano
Segmento sexual renal		Ao longo de todo o ano, com provável intensificação da atividade secretora no segundo semestre
Crescimento folicular		Não foram obtidas informações suficientes
Ovos		Não foram amostradas fêmeas com ovos

Figura 31 – Cortes histológicos de machos de *Amphisbaena anomala*

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. testículo de macho coletado em dezembro, mostrando apenas espermatogônias nos túbulos seminíferos e tecido intersticial espesso (MPEG 22141); B. ducto deferente posterior com espermatozoides na luz, de macho coletado em dezembro em fase não espermiogênica (MPEG 22138); C. testículo de macho coletado em março, em fase espermiogênica, com espermatozoides soltos na luz dos túbulos seminíferos (MPEG 7772); D. testículo de macho coletado em maio, com a fase espermiogênica iniciada, porém com espermatozoides ainda em formação (MPEG 6523); E. segmento sexual renal em atividade secretora, de macho coletado em março (túbulos não secretores, não formadores do segmento sexual, podem ser vistos embaixo, à esquerda) (MPEG 7772); F. corte de rim de macho coletado em junho, mostrando o segmento sexual renal em fase não secretora (MPEG 8802). dd: ducto deferente; ept: epitélio do ducto deferente; SSR: segmento sexual renal; stg: espermatogônias; ★: espermatozoides; *: espermatozoides em formação. Coloração: hematoxilina/eosina.

4.1.3 *Amphisbaena dubia*

Foram amostrados 20 fêmeas e 23 machos adultos de *Amphisbaena dubia*, todos coletados na ecorregião de Florestas Costeiras da Serra do Mar, no bioma da Mata Atlântica (Figura 32). Nessa região, considerada de clima subtropical úmido segundo a classificação de Köppenn-Geiger (PEEL et al., 2007) e subquente superúmida segundo Nimer (1979), quatro estações são razoavelmente bem definidas. Assim, para as análises de variação das medidas de gônadas e ductos genitais de *A. dubia*, os dados foram separados em quatro níveis do fator (i.e. verão, outono, inverno e primavera), segundo as datas de coleta dos espécimes. O menor macho adulto amostrado apresentava 209 mm de CRC, e a menor fêmea adulta, 226 mm.

Os dados de comprimento do maior folículo ou ovo medido em cada fêmea estão apresentados no gráfico de dispersão da figura 33, segundo as datas de coleta desses espécimes. Esse gráfico sugere um aumento nos comprimentos dos folículos em vitelogênese secundária a partir do mês de julho, que se prolonga pelo menos até o mês de outubro, quando se registrou o maior folículo ovariano dessa amostra, de 21,42 mm. Já no final de novembro e em dezembro foram observadas fêmeas com ovos nos ovidutos, sugerindo que a ovulação deva ocorrer durante o mês de novembro.

Ainda no gráfico da figura 33, nota-se que foram registradas entre setembro e dezembro, além dos espécimes com folículos aumentados e ovos, quatro fêmeas em vitelogênese primária e uma fêmea com folículos secundários com comprimentos inferiores a 10 mm. Esse quadro sugere que as fêmeas da espécie não entram em fase reprodutiva anualmente, sendo seu ciclo no mínimo bienal.

Figura 32 – Distribuição das localidades de coleta dos espécimes de *Amphisbaena dubia* adultos amostrados, nos biomas e ecorregiões brasileiros (à esquerda e à direita, respectivamente)

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

Figura 33 – Gráfico de dispersão dos valores de comprimento do maior folículo ou ovo medido em cada fêmea adulta de *Amphisbaena dubia*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Por meio de análises histológicas, foram observadas variações morfológicas no oviduto médio das fêmeas ao longo do ciclo reprodutivo. Foram coletadas amostras para processamento histológico de 14 fêmeas, com datas de coleta distribuídas ao longo de nove meses do ano (não foram obtidas amostras de fevereiro, junho e julho). Todas as fêmeas apresentavam ovidutos médios com endométrio composto por um epitélio simples, cúbico, e uma lâmina própria de tecido conjuntivo. Naquelas fêmeas com folículos primários ou folículos secundários com menos de 9 mm não foram observadas glândulas na mucosa, mas apenas pequenas dobras do epitélio (Figura 34A). Já nas fêmeas com folículos secundários de comprimento maior do que 9 mm, foram observadas pequenas glândulas imersas no tecido conjuntivo da mucosa do oviduto médio. Em agosto, quando foram amostradas fêmeas com folículos de até 11,5 mm, essas glândulas estão bem definidas e seu diâmetro quase equivale à própria espessura da lâmina própria do endométrio (Figura 34B). Uma fêmea amostrada em outubro, com folículos de mais de 20 mm de comprimento, apresentava lâmina própria quase completamente ocupada por essas glândulas, que nessa fase já se encontram repletas de gotículas de secreção (Figura 34C). Nas fêmeas com ovos, o endométrio ainda aparece tomado por glândulas, e é possível observar gotículas de secreção na luz do oviduto (Figura 34D).

Já na parte posterior do oviduto, não foram observadas glândulas em qualquer fase do ciclo reprodutivo. Nessa região, notam-se dobras no endométrio tanto em fêmeas em vitelogênese secundária quanto naquelas em vitelogênese primária (Figuras 34 E e F). No entanto, as primeiras exibem epitélio com células e núcleos alongados, diferente dos

espécimes em vitelogenese primária, que apresentam epitélio cúbico, com núcleos arredondados.

Figura 34 – Cortes histológicos de ovidutos de *Amphisbaena dubia*

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. oviduto médio de fêmea em vitelogenese primária, coletada no mês de janeiro (CRIB 432); B. oviduto médio de espécime coletado em agosto, com folículos de até 11,5 mm, mostrando glândulas no tecido conjuntivo da lâmina própria (CRIB 368); C. oviduto médio de fêmea de outubro, e que apresentava folículos de até 21,5 mm, com glândulas ocupando quase todo o endométrio (CRIB 208); D. oviduto médio de fêmea com ovos, mostrando endométrio glandular e secreção na luz (CRIB 384); E. oviduto posterior da mesma fêmea da imagem B; F. oviduto posterior da mesma fêmea da imagem A. ep: epitélio do oviduto; gl: glândula; lp: lâmina própria; m: miométrio. Coloração: hematoxilina/eosina.

Para as análises de ciclo reprodutivo dos machos, as medidas de volume dos testículos, diâmetro do ducto deferente, e comprimento e diâmetro dos rins foram submetidas a análise de regressão linear com o comprimento rostro-cloacal, cujos índices p e R^2 estão apresentados na tabela 4. Nenhuma dessas variáveis mostrou-se significativamente relacionada ao comprimento do corpo, e por isso a comparação entre as médias das mesmas por estação foi analisada por meio de ANOVA. Quanto à normalidade da distribuição dos dados, as medidas de volume testicular e diâmetro do ducto deferente diferiram significativamente de uma distribuição normal, segundo o teste de Shapiro-Wilk ($p = 0,001$ e $p = 0,002$, respectivamente). Essas variáveis foram então transformadas por meio de logaritmo natural, resultando então em distribuições normais ($p = 0,145$ e $p = 0,082$, respectivamente). Foi constatada igualdade de variâncias em todas as variáveis, por meio do teste de Levene.

Tabela 4 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de *Amphisbaena dubia*

Grupo amostral	Variável	N	Regressão linear		N (por estação)	ANOVA		K-W
			p	R ²		p	F	
Amostra completa	Volume testicular	23	0,247	0,012	6/4/5/8	0,092*	2,483*	0,143
	Diâmetro do ducto deferente	23	0,222	0,070	6/4/5/8	0,270*	1,412*	0,303
	Comprimento do rim	22	0,187	0,085	6/4/5/8	0,826	0,298	0,529
	Diâmetro do rim	22	0,080	0,145	6/4/5/8	0,493	0,832	0,401
Amostra sem o outlier CRIB 284	Volume testicular	22	0,783	0,004	6/4/5/7	0,035*	3,552*	0,070
	Diâmetro do ducto deferente	22	0,485	0,025	6/4/5/7	0,480*	0,459*	0,463
	Comprimento do rim	21	0,329	0,050	6/4/5/7	0,869	0,237	0,573
	Diâmetro do rim	21	0,138	0,112	6/4/5/7	0,557	0,714	0,429

K-W: teste de Kruskal-Wallis. Os índices p considerados significativos ($p < 0,05$) estão em negrito.

*A variável não tem distribuição normal, e por isso foram usados para análise os dados submetidos a transformação logarítmica (ln).

O gráfico de dispersão dos dados de volume testicular segundo a data de coleta de cada espécime mostra um aumento bem marcado nessa medida entre os meses de março e julho – durante o outono e até o início do inverno (Figura 35). No entanto, o dado do espécime CRIB 284, coletado no mês de setembro, se destacou dos demais. Esse espécime apresentou um valor de volume testicular semelhante aos observados durante o outono, e muito mais alto do que os demais machos coletados na primavera e no verão. O diagrama boxplot da figura 36 apresenta os dados de volume testicular organizados em estações do ano, e evidencia não apenas o aumento desses valores no outono, como também destaca o espécime CRIB 284 como um outlier. É possível que sua data de coleta, registrada em

coleção, seja diferente da data de morte do mesmo, informação essa não constante no livro-tombo. Tendo em vista essa dúvida quanto à data de coleta e morte desse espécime, as análises das variáveis para caracterização do ciclo reprodutivo dos machos de *A. dubia* foram realizadas alternativamente desconsiderando os dados daquele espécime. O teste de ANOVA considerando a amostra completa resulta na não-significância das diferenças entre as médias de volume testicular ao longo do ano ($p = 0,092$). Por outro lado, quando eliminado o dado do referido outlier, o mesmo teste aponta uma diferença significativa entre essas médias. O teste post-hoc de Tukey mostrou que a média obtida para o outono difere significativamente da média observada na primavera ($p = 0,008$), mas não das médias do verão e inverno ($p = 0,078$ e $p = 0,080$, respectivamente).

Figura 35 – Gráfico de dispersão dos valores de volume testicular de *Amphisbaena dubia* adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 36 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular de *Amphisbaena dubia*, segundo as datas de coleta dos espécimes, organizados segundo as estações do ano

As medidas de diâmetro dos ductos deferentes, por sua vez, apresentam seus maiores valores entre julho e dezembro - período coincidente com o intervalo entre a fase de observação dos maiores volumes testiculares (de março a julho) e a época em que foram amostradas fêmeas com ovos nos ovidutos (em novembro e dezembro). No gráfico de dispersão desses valores também é possível notar a ocorrência de ductos deferentes enovelados a partir de maio, que em sua maioria correspondem aos maiores diâmetros observados (Figura 37). Há apenas uma exceção, em que um espécime amostrado no mês de maio apresentava os ductos enovelados, mas de diâmetro menor em relação aos outros espécimes do mesmo mês.

O diagrama boxplot da figura 38 apresenta os dados de diâmetro dos ductos deferentes organizados por estações do ano, e evidencia o aumento desses valores na primavera. Esse aumento, no entanto, não é significativo segundo ANOVA, tanto na amostra completa quanto na amostra que exclui o espécime para o qual há dúvida quanto à confiabilidade do registro de data de coleta ($p = 0,222$ e $p = 0,485$, respectivamente). Ainda no boxplot da figura 38, nota-se um outlier severo no inverno, correspondente ao dado do espécime CRIB 404. Esse indivíduo foi coletado em 13 de julho, sendo portanto o primeiro a apresentar ductos enovelados com diâmetro aumentado.

Figura 37 – Gráfico de dispersão dos dados de diâmetro dos ductos deferentes de *Amphisbaena dubia* adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 38 – Diagrama boxplot dos dados de diâmetro dos ductos deferentes de *Amphisbaena dubia* adultos, organizados em estações do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes

Diferente as variáveis volume testicular e de diâmetro dos ductos deferentes, as medidas de comprimento e diâmetro do rim em *A. dubia* não apresentam variação evidente ao longo do ano, nos gráficos de dispersão desses dados (Figuras 39 e 40). Com efeito, nenhuma dessas variáveis apresenta diferença significativa entre as médias obtidas para cada estação do

ano, segundo ANOVA, seja considerada a amostra completa ou retirado o espécime CRIB 284, como mostram os valores p resumidos na tabela 4.

Figura 39 – Gráfico de dispersão dos dados de comprimento dos rins de *Amphisbaena dubia* adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 40 – Gráfico de dispersão dos dados de diâmetro dos rins de *Amphisbaena dubia* adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes

Foram obtidas amostras histológicas de rins, testículos e ductos deferentes de 15 machos adultos de *Amphisbaena dubia*, coletados em diferentes meses do ano. Não foi possível obter amostras dos meses de março, abril, junho e outubro.

Por meio das análises histológicas, observou-se que nos meses de janeiro e fevereiro (verão) os testículos apresentam somente espermatogônias nos túbulos seminíferos ou, no máximo, espermatócitos (Figura 41A). Em março e abril há uma falha na amostragem de material para análises histológicas, e por isso não é possível caracterizar o desenvolvimento do epitélio seminífero nesse intervalo. Em maio, já se observam espécimes em fase espermiogênica, sugerindo desenvolvimento rápido do epitélio seminífero nessa espécie. Entre maio e agosto (abrangendo parte do outono e do inverno), todos os oito espécimes amostrados apresentavam-se espermiogênicos (Figura 41B). Logo, o aumento de volume testicular em março, e a queda nesses volumes, em julho, precedem o início e o final da fase espermiogênica. Em setembro, e até o mês de dezembro, apenas espermatogônias são observadas nos túbulos seminíferos (Figura 41C), caracterizando uma fase de repouso reprodutivo.

Dos dois espécimes amostrados no mês de maio, ambos já em fase espermiogênica, um apresentava espermatozóides nos ductos deferentes, ao passo que o outro ainda tinha seus ductos vazios, sugerindo que esse indivíduo se encontrava no início do período de produção de espermatozóides. A partir de então, e até o mês de novembro, todos os dez espécimes amostrados apresentavam espermatozóides nos ductos deferentes (Figura 41D). Assim, de setembro a novembro, após o término da fase espermiogênica, os espermatozóides são mantidos estocados nos ductos. Um único espécime de dezembro teve amostras coletadas para análise histológica, e já não foram observados espermatozóides em seus ductos deferentes. Assim, é provável que a cópula nessa espécie tenha lugar entre novembro e dezembro, meses nos quais foram amostradas fêmeas com ovos nos ovidutos.

Apesar de não terem sido observadas variações ao longo do ano nas medidas de comprimento e diâmetro dos rins de *A. dubia*, as análises histológicas permitiram observar variações morfológicas no segmento sexual renal durante o ciclo reprodutivo. Entre os dois espécimes espermiogênicos amostrados em maio, um apresentava os túbulos do SSR secretores, ao passo que o outro (provavelmente iniciando sua fase espermiogênica, como mencionado anteriormente) não mostrava essa atividade secretora (Figuras 41E e F). Todos os machos amostrados a partir de maio e até o final da fase de estocagem de esperma, em novembro, apresentavam o SSR secretor, e suas células alongadas e com núcleo basal. De dezembro até fevereiro, durante a fase de repouso reprodutivo, os cinco espécimes amostrados tinham os túbulos do SSR sem atividade secretora, e suas células com núcleo central.

Figura 41 – Cortes histológicos de machos de *Amphisbaena dubia*

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. testículo de macho coletado em janeiro, mostrando túbulos seminíferos com espermatogônias e espermatócitos (CRIB 336); B. testículo de macho coletado em julho, em fase espermiogênica (CRIB 404); C. testículo de macho coletado em setembro, após o fim da fase espermiogênica, apresentando apenas espermatogônias nos túbulos seminíferos (CRIB 299); D. ducto deferente do mesmo macho da foto C, mostrando estocagem de esperma; E. segmento sexual renal secretor, de macho coletado em maio (CRIB 424); F. segmento sexual renal sem atividade secretora, de macho também coletado em maio (CRIB 433). Coloração: hematoxilina/eosina.

O quadro 3 resume as características dos ciclos de machos e fêmeas de *A. dubia*, inferidas com base nos dados acima apresentados.

Quadro 3 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *Amphisbaena dubia*, inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos

Sazonalidade do ciclo reprodutivo	Machos	Sazonal
	Fêmeas	Sazonal, pelo menos bienal
Repouso testicular		Setembro a dezembro (primavera)
Desenvolvimento do epitélio seminífero		Possivelmente de janeiro a abril (verão e início do outono)
Espermiogênese		De maio a agosto (outono e inverno)
Espermatozóides nos ductos deferentes		De maio a novembro (outono, inverno e primavera)
Segmento sexual renal		De maio a novembro (outono, inverno e primavera)
Crescimento folicular		De julho a outubro (inverno e primavera)
Ovos		Novembro e dezembro (primavera)

4.1.4 *Amphisbaena infraorbitale*

Entre os 55 espécimes de *Amphisbaena infraorbitale* amostrados neste estudo, 34 fêmeas e 19 machos eram adultos, e puderam ser utilizados para as análises de ciclo reprodutivo. O menor macho adulto amostrado apresentava 358 mm de CRC, e a menor fêmea, 331 mm. Esses espécimes provieram de seis diferentes localidades, inseridas nas ecorregiões de Cerrado e Matas Secas de Chiquitano (nos biomas Cerrado e Amazônia, respectivamente) (Figura 42). Visto que essas duas ecorregiões apresentam clima quente semi-úmido, com uma estação seca bem marcada (NIMER, 1979), para as análises de variação das medidas de gônadas e órgãos genitais ao longo do ano, esses dados foram separados entre as estações seca e chuvosa, segundo as datas de coleta dos espécimes.

Figura 42 – Distribuição das localidades de coleta dos espécimes de *Amphisbaena infraorbitale* adultos amostrados, nos biomas e ecorregiões brasileiros (à esquerda e à direita, respectivamente)

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A maior parte das fêmeas foi coletada em localidades de Matas Secas de Chiquitano, sendo apenas quatro providas de localidades na ecorregião de Cerrado. Como se observa pelo gráfico de dispersão da figura 43, as fêmeas amostradas até o mês de junho apresentavam folículos primários, ou folículos secundários de no máximo 9 mm de comprimento. Já entre as cinco fêmeas coletadas no mês de julho, duas tinham folículos entre 10 e 15 mm, e em agosto, foi registrada uma fêmea com folículos de mais de 20 mm. Assim, a fase mais ativa de deposição de vitelo parece ocorrer entre julho e agosto, ao final da estação seca, nessa espécie.

De setembro e outubro, foram amostradas 17 fêmeas, todas com ovos nos ovidutos. O elevado número de espécimes de *A. infraorbitale* que pôde ser observado nessa fase do ciclo reprodutivo pode ser explicado pelo fato de que esses espécimes foram coletados em resgates de fauna na UHE Guaporé, no município de Pontes e Lacerda, no estado do Mato Grosso. Todas as fêmeas com ovos amostradas foram coletadas nesses resgates, sendo uma em 3 de setembro de 2002 e as demais entre 1 e 4 de outubro do mesmo ano. Não se obtiveram amostras de outras localidades para os meses de setembro e outubro, mas foram examinadas outras fêmeas coletados naquela UHE, coletados nos meses de maio, junho, julho e agosto. Entre as fêmeas das demais localidades, há amostras de fevereiro, março, junho e julho.

Considerando-se os dados das fêmeas coletadas na UHE Guaporé, é interessante observar que as fêmeas da população não entram todas em fase reprodutiva simultaneamente: entre as duas fêmeas de agosto, ambas coletadas naquela localidade, uma apresenta folículos já bem aumentados, com mais de 21 mm, ao passo que a outra apresenta folículos com no máximo 7 mm. Uma vez que esses dois espécimes foram coletados no mesmo ano, com apenas 15 dias de diferença entre uma captura e outra, esse fato pode sugerir ciclo bienal para a espécie, ou uma diferença de fase entre fêmeas de uma mesma população.

Figura 43 – Gráfico de dispersão dos valores de comprimento do maior folículo ou ovo medido em cada fêmea adulta de *Amphisbaena infraorbitale*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Para análise histológica, obtiveram-se amostras dos ovidutos de 23 fêmeas adultas de *A. infraorbitale*, coletadas em diferentes meses do ano, com exceção de janeiro, abril, novembro e dezembro. Os ovidutos dessa espécie apresentam, em sua porção média, epitélio simples e cúbico e lâmina basal de tecido conjuntivo; externas a esse endométrio, estão as fibras musculares do miométrio. No endométrio, inseridas no tecido conjuntivo da lâmina basal, foram observadas glândulas de origem epitelial. Entre as fêmeas em vitelogênese primária e início da vitelogênese secundária, coletadas entre fevereiro e junho, essas glândulas podem se apresentar muito reduzidas (Figura 44A) ou bem conspícuas, embora sem secreção evidente (Figura 44B). A presença, nesse período, de espécimes com glândulas em dois estágios diferentes de desenvolvimento sugere que essas fêmeas estivessem em fases diferentes do ciclo reprodutivo, podendo portanto indicar bienalidade reprodutiva. Não foram observadas glândulas na porção posterior do oviduto dessas fêmeas (Figura 44C).

Também foram observados dois diferentes estágios de desenvolvimento das glândulas do endométrio entre os quatro espécimes do mês de julho que foram amostrados para as análises histológicas. Desses, dois (com folículos entre 5 e 9 mm) não tinham glândulas evidentes no endométrio, ao passo que outros dois (com folículos entre 7 e 12 mm) tinham glândulas bem delimitadas, embora ainda não secretoras, não apenas na porção média como também na parte posterior dos ovidutos (Figura 44E). Esses dados indicam que a fase final de deposição de vitelo deva se iniciar quando os folículos apresentam entre 5 e 10 mm. Glândulas bem evidentes também foram observadas em uma fêmea do mês de agosto, que apresentava folículos de até 21,5 mm.

Nos espécimes de setembro e outubro, que apresentavam ovos nos ovidutos, as glândulas se encontravam secretoras, ocupando quase toda a espessura do endométrio, no oviduto médio (Figura 44D). O oviduto posterior, nessas fêmeas, passa a apresentar não apenas glândulas secretoras, mas também dobras no endométrio e epitélio colunar (Figura 44E). Na porção posterior do infundíbulo, nas fêmeas grávidas, observou-se também a presença de estruturas semelhantes a glândulas, de origem epitelial, porém sem atividade secretora e apresentando cílios (Figura 44F). Essas estruturas assemelham-se a túbulos de estocagem de esperma, já observados em outros Squamata (FOX, 1977; SAINT-GIRONS, 1985; BLACKBURN 1998; SIEGEL et al., 2011). O oviduto anterior mostra ainda epitélio colunar, formado por células ciliares e células secretoras.

Figura 44 – Cortes histológicos de ovidutos de *Amphisbaena infraorbitale*

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. oviduto médio de fêmea coletada em fevereiro, apresentando glândulas pequenas no endométrio (UFMT 3465); B. oviduto médio de fêmea coletada em março, com glândulas bem delimitadas, algumas com o duto aparente e sugestivo da origem epitelial das mesmas (*) (CHUNB 30712); C. oviduto posterior da mesma fêmea da foto anterior, mostrando epitélio cúbico e ausência de glândulas; D. oviduto médio de fêmea grávida, coletada em outubro, exibindo a lâmina própria do endométrio ocupada por glândulas secretoras (UFMT 3439); E. oviduto distal da mesma fêmea da foto anterior, mostrando glândulas e dobras no endométrio e epitélio colunar; F. região posterior do infundíbulo da mesma fêmea das fotos D e E, com epitélio colunar formado por células ciliadas e células secretoras, e mostrando possível túbulo de estocagem de esperma (*), com ducto ciliado (seta). ept: epitélio; gl: glândula; lp: lâmina própria; m: miométrio. Coloração: hematoxilina/eosina.

Para a análise do ciclo reprodutivo dos machos de *A. infraorbitale*, as medidas de volume testicular e diâmetro do ducto deferente foram submetidas a ANOVA, tendo como níveis do fator as estações seca e chuvosa. As medidas de comprimento e diâmetro dos rins apresentaram-se significativamente relacionadas ao CRC, segundo análise de regressão linear ($p < 0,001$ e $p = 0,021$, respectivamente), e por isso foram analisadas por meio de ANCOVA, tendo como co-variável o CRC. Os índices p e R^2 , resultantes das análises de regressão linear, bem como os índices resultantes das análises ANOVA e ANCOVA discutidas a seguir encontram-se resumidos na tabela 5.

As variáveis analisadas foram ainda submetidas aos testes de Levene e Shapiro-Wilk, para verificar as hipóteses de homocedasticidade e normalidade, pressupostos para ANOVA e ANCOVA. Apenas os valores de volume testicular não atenderam a essas premissas (Levene resultou em $p = 0,030$, e Shapiro-Wilk, em $p = 0,028$), mesmo se submetidos a transformação logarítmica. Por isso, a variação no volume testicular entre as estações seca e chuvosa foi avaliada considerando apenas o teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 5 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de *Amphisbaena infraorbitale*

Variável	N	Regressão linear		N (seca/chuvosa)	ANOVA/ANCOVA		K-W p
		p	R ²		p	F	
Volume testicular	19	0,204	0,093	13 / 6	<0,001*	19,381*	0,001*
Diâmetro do ducto deferente	19	0,233	0,083	13 / 6	0,124	0,262	0,161
Comprimento do rim	19	<0,001	0,616	13 / 6	0,494	0,489	0,792
Diâmetro do rim	19	0,021	0,275	13 / 6	0,195	1,830	0,483

K-W: teste de Kruskal-Wallis.

Os índices p considerados significativos ($p < 0,05$) estão em negrito.

*A variável não tem distribuição normal nem distribuição homogênea de variâncias, mesmo quando submetida a transformação logarítmica, e por isso deve ser considerado apenas o teste de Kruskal-Wallis.

A amostragem de machos de *A. infraorbitale* foi mais limitada em comparação com aquela obtida para as fêmeas, abrangendo apenas os meses de maio, junho, julho, agosto e outubro. Ainda assim, no gráfico de dispersão dos volumes testiculares, é possível notar um pico desses valores entre maio e julho, seguido de uma queda entre os meses de agosto e outubro (Figura 45). No entanto, devido à falha amostral entre novembro e abril, não é possível dizer a partir de que mês ocorre o aumento de tais volumes. O diagrama boxplot desses dados (Figura 46), organizados por estação do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes, evidencia a ocorrência de maiores volumes testiculares na estação seca (que ocorre de abril a agosto). A diferença entre as médias de cada estação obtidas para essa variável é significativa segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,001$).

Figura 45 – Gráfico de dispersão dos valores de volumes testiculares de machos adultos de *Amphisbaena infraorbitale*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 46 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular de *Amphisbaena infraorbitale* adultos, divididos por estações do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes

Os diâmetros dos ductos deferentes, diferente dos volumes testiculares, não exibiram variação evidente no gráfico de dispersão segundo as datas de coleta dos espécimes (Figura 47). Apenas podemos notar, nesse gráfico, que os maiores valores de diâmetro correspondem aos ductos que se apresentavam enovelados. Esses foram observados nos meses de julho e agosto, sobrepondo em parte a época em que se observaram os maiores volumes testiculares (de maio a julho). Segundo ANOVA, não há variação significativa nos diâmetros dos ductos deferentes entre as estações seca e chuvosa ($p = 0,124$).

Figura 47 – Gráfico de dispersão dos valores de volumes testiculares de machos adultos de *Amphisbaena infraorbitale*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Também não foram observadas variações nas medidas de comprimento e diâmetro dos rins em machos de *A. infraorbitale*, nos gráficos de dispersão desses dados (Figuras 48 e 49). Os testes de ANCOVA não apontam, de fato, diferenças significativas dessas variáveis entre as estações seca e chuvosa ($p = 0,494$ para comprimento do rim, e $p = 0,195$ para diâmetro do rim).

Figura 48 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre comprimento do rim e comprimento rostro-cloacal, em *Amphisbaena infraorbitale* machos adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 49 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do rim e comprimento rostro-cloacal, em *Amphisbaena infraorbitale* machos adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes

Foram amostrados fragmentos de testículos, ductos deferentes e rins de 15 machos, coletados nos meses de maio, junho, julho, agosto e outubro, para análise histológica. Por meio dessas análises, foi possível observar que entre os 12 espécimes coletados de maio a agosto – portanto, durante a fase na qual se registraram os maiores volumes testiculares – havia 9 indivíduos com o epitélio seminífero completamente desenvolvido, produzindo espermatozóides (Figura 50A). Porém, também foram observados nesse mesmo período três indivíduos com testículos em repouso, apenas com espermatogônias. Esse padrão pode indicar reprodução bienal também para os machos da espécie. Os três machos amostrados em outubro apresentavam apenas espermatogônias nos túbulos seminíferos (Figura 50B), o que sugere que a espermiogênese pode ocorrer somente na estação seca, e portanto em ciclo sazonal. Nos cortes histológicos de ductos deferentes, observaram-se espermatozóides entre junho e agosto, nos machos que se apresentavam em fase espermiogênica. Nesses espécimes, o epitélio dos ductos apresentava-se colunar, com núcleos basais, e acúmulo de secreção na porção apical das células (Figura 50C). Não é possível dizer se há estocagem de esperma em setembro devido à falta de amostras desse mês, porém em outubro todos os espécimes amostrados tinham seus ductos deferentes vazios e com epitélio não secretor (Figura 50D), o que coincide com a época em que foram encontradas fêmeas com ovos nos ovidutos – setembro e outubro. O segmento sexual renal dos machos dessa espécie apresentou atividade secretora entre junho e agosto, durante as fases de produção de espermatozóides e de presença de esperma nos ductos deferentes (Figura 50E). Nos espécimes que não se encontravam em

fase espermiogênica nesse período, bem como naqueles amostrados no mês de outubro, os túbulos do segmento sexual renal não se mostraram secretores (Figura 50F).

Figura 50 – Cortes histológicos de machos adultos de *Amphisbaena infraorbitale*

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. testículo em fase espermiogênica, de macho coletado no mês de maio (UFMT 3362); B. testículo de macho coletado em outubro, mostrando apenas espermatogônias no epitélio seminífero (UFMT 3431); C. porção posterior do ducto deferente de um macho coletado em julho, mostrando epitélio colunar e secretor, e espermatozoides na luz (UFMT 5271); D. ducto deferente de macho coletado em outubro, com epitélio não secretor e ausência de espermatozoides (CHUNB 25044); E. rim do mesmo macho da foto C, mostrando os túbulos do segmento sexual renal hipertrofiados e secretores; F. rim do mesmo macho da foto B, sem atividade secretora no segmento sexual renal. Coloração: hematoxilina/eosina.

O quadro 4 resume as características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *A. infraorbitale*, inferidas com base nos dados macroscópicos e de histologia acima apresentados.

Quadro 4 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *Amphisbaena infraorbitale*, inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos

Sazonalidade do ciclo reprodutivo	Machos	Sazonal, possivelmente bienal
	Fêmeas	Sazonal
Repouso testicular	A partir de outubro	
Desenvolvimento do epitélio seminífero	Dados insuficientes	
Espermio gênese	Maio a agosto (estação seca)	
Espermatozóides nos ductos deferentes	Junho a agosto (estação seca)	
Segmento sexual renal	Junho a agosto (estação seca)	
Crescimento folicular	Julho e agosto (final da estação seca)	
Ovos	Setembro e outubro (estação chuvosa)	

4.1.5 *Amphisbaena kingi*

Entre os 66 espécimes de *Amphisbaena kingi* amostrados, 31 fêmeas e 17 machos eram adultos e puderam ser utilizados nas análises de ciclo reprodutivo. O menor macho adulto apresentou 176 mm de CRC, e a menor fêmea adulta, 182mm. Esses espécimes são provenientes de duas localidades, ambas da ecorregião dos campos sulinos – bioma dos Pampas (Figura 51). Essa região apresenta clima mesotérmico brando, temperado e superúmido, com quatro estações definidas (NIMER, 1979). Por isso, para as análises de variação nas medidas de gônadas, rins e ductos genitais ao longo do ano, esses dados foram separados, conforme as datas de coleta dos espécimes, em primavera, verão, outono e inverno.

Figura 51 – Localidades de coleta dos espécimes de *Amphisbaena kingi* adultos amostrados, e sua distribuição nos biomas e ecorregiões brasileiros

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A amostragem de fêmeas de *A. kingi* não permitiu observar o período do ano durante o qual acontece a fase de maior aumento dos folículos secundários, uma vez que todos os espécimes amostrados apresentavam folículos primários, folículos secundários de até 8 mm de comprimento ou ovos nos ovidutos (Figura 52). Na ausência de amostragem de fêmeas com folículos em fases mais avançadas da deposição de vitelo, não é possível caracterizar satisfatoriamente, quanto à sua duração de época de ocorrência, a fase final de vitelogênese secundária nessa espécie. No entanto, pode-se inferir que a mesma se desenrole durante a primavera, dado o registro de fêmeas com ovos no final de novembro e início de janeiro. As duas fêmeas observadas com ovos foram coletadas em 23 de novembro de 2004 e em 2 de janeiro de 2005, provavelmente em uma mesma estação reprodutiva. A observação de ovos em datas com pouco mais de um mês de diferença poderia sugerir um período de retenção dos ovos nos ovidutos das fêmeas ou de estocagem de esperma nos ovidutos. A amostragem de fêmeas em vitelogênese primária em outubro e dezembro, por sua vez, levanta a possibilidade de um ciclo reprodutivo bienal para as fêmeas da espécie, uma vez que nem todas as fêmeas entram em fase reprodutiva ao mesmo tempo.

Figura 52 – Gráfico de dispersão dos comprimentos do maior folículo ou ovo medido em cada fêmea adulta de *Amphisbaena kingi*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Sob microscopia de luz, os ovidutos de fêmeas amostradas em vitelogênese primária ou secundária (portanto, com folículos de até 8 mm) mostraram o endométrio formado por epitélio simples, cúbico, sobre lâmina basal de tecido conjuntivo. No endométrio de três espécimes, com folículos de até 7 mm, puderam ser observadas pequenas glândulas, ainda

pouco conspícuas (Figura 53). As demais fêmeas não grávidas não apresentavam tais glândulas. Já nas fêmeas que tinham ovos nos ovidutos, foi possível observar muitas glândulas em atividade secretora, ocupando toda a lâmina basal, e a luz do oviduto se mostrou quase completamente ocupada por secreção. Os ovidutos dessas fêmeas não se encontravam em estado satisfatório de conservação, de modo que as fotos obtidas não apresentam qualidade adequada, embora tenha sido possível observar suas características morfológicas ao microscópio de luz.

Figura 53 – Corte histológico de fêmea de *Amphisbaena kingi* em vitelogênese secundária, mostrando glândulas no endométrio

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

Ept: epitélio; gl: glândula; lp: lâmina própria. Coloração: hematoxilina/eosina

A amostra de machos apresentou um problema para a análise de variação, entre as estações do ano, dos valores de volume testicular, diâmetro do ducto deferente e comprimento e diâmetro dos rins, uma vez que contou com apenas um espécime coletado no verão. Para evitar distorções nas análises de ANOVA e ANCOVA, que comparam as médias dos níveis do fator, as mesmas foram realizadas apenas com os dados das demais estações do ano. Nos gráficos de dispersão e diagramas boxplot, no entanto, todos os dados obtidos estão apresentados.

As variáveis dos machos a serem analisadas foram submetidas a análise de regressão linear com o CRC, que apontou relação significativa apenas entre o comprimento do rim e o comprimento rostro-cloacal, razão pela qual a variação dessa medida ao longo do ano foi testada por meio de ANCOVA. Segundo o teste de Shapiro-Wilk, apenas os dados de

diâmetro dos ductos deferentes não apresentam distribuição normal ($p = 0,007$). Essa distribuição, no entanto, se adéqua à normalidade quando transformado com logaritmo natural ($p = 0,086$). Assim, para a análise dessa variável por meio de ANOVA, foram utilizados os valores transformados. Quanto à homocedasticidade, o diâmetro dos ductos deferentes e o diâmetro dos rins não apresentaram variâncias homogêneas segundo o teste de Levene, mesmo quando submetidos à transformação logarítmica ($p = 0,002$ e $p = 0,001$, respectivamente). Por isso, a comparação de médias por estação dessas variáveis foi feita considerando o teste de Kruskal-Wallis. A tabela 6 resume os valores p , F e R^2 obtidos das análises de regressão linear, ANOVA ou ANCOVA e Kruskal-Wallis das variáveis volume testicular, diâmetro do ducto deferente e diâmetro e comprimento dos rins, e que serão comentados a seguir.

Tabela 6 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de *Amphisbaena kingi*

Variável	N	Regressão linear		N (outono/ inverno/primavera)	ANOVA/ ANCOVA		K-W
		p	R ²		p	F	p
Volume testicular	16	0,011	0,377	4 / 10 / 2	0,05	3,795	0,043
Diâmetro do ducto deferente	16	0,381	0,055	4 / 10 / 2	0,530*	0,666*	0,901**
Comprimento do rim	16	0,036	0,278	4 / 10 / 2	0,986	0,014	0,581**
Diâmetro do rim	16	0,233	0,086	4 / 10 / 2	0,503	0,724	0,462

K-W: teste de Kruskal-Wallis.

Os índices p considerados significativos ($p < 0,05$) estão em negrito.

*A variável não tem distribuição normal, e por isso foram usados para análise os dados submetidos a transformação logarítmica (ln).

** A amostra não apresenta distribuição homogênea das variâncias, e por isso o teste de Kruskal-Wallis é mais confiável para a análise de variação das médias.

Apesar da falha amostral entre fevereiro e abril, e da escassez de dados entre setembro e janeiro, é possível perceber no gráfico de dispersão dos dados de volume testicular segundo as datas de coleta dos espécimes (Figura 54) um aumento nesses valores entre maio e setembro. Essa variação, com pico no inverno (de 22 de junho a 21 de setembro), fica

evidente no diagrama boxplot da figura 55. A diferença entre as médias obtidas para o outono, inverno e primavera não é significativa segundo ANOVA ($p = 0,05$), ao passo que Kruskal-Wallis aponta variação significativa dos volumes testiculares entre essas estações ($p = 0,043$). Essa diferença entre as análises paramétrica e não-paramétrica provavelmente se deve à desigualdade amostral entre os níveis do fator, mostrada na tabela 6.

Figura 54 – Gráfico de dispersão dos dados de volume testicular de machos adultos de *Amphisbaena kingi*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 55 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular de *Amphisbaena kingi* adultos, organizados por estações do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes

As análises histológicas dos testículos mostraram apenas espermatogônias nos túbulos seminíferos dos dois machos amostrados em janeiro e maio – verão e primeira metade do outono. O macho coletado no mês de janeiro, que apresenta o maior comprimento rostro-cloacal observado nessa amostra (215 mm), mostrava túbulos seminíferos de diâmetro reduzido, bem separados por tecido conjuntivo intersticial e com poucas espermatogônias, além de uma túnica albugínea espessa (Figura 56A). Esse espécime se encontrava, portanto, em uma fase de repouso testicular acentuado. O espécime de maio, por sua vez, apresentava uma maior quantidade de espermatogônias nos túbulos seminíferos, provavelmente em fase de multiplicação (Figura 56B). Dos três espécimes de junho e julho para os quais foram coletadas amostras para processamento histológico, um mostrava espermatogônias em fase de multiplicação, e dois já apresentavam espermátócitos e espermátides (Figura 56C). Ainda durante o inverno, em agosto, foram amostrados dois espécimes em fase inicial de diferenciação dos espermatozóides. Porém, a fase mais ativa da espermiogênese ocorre em setembro e outubro (Figura 56D), quando também foram observados espermatozóides nos ductos deferentes (Figura 56E). Devido à falha de amostragem em novembro, não é possível afirmar se há estocagem de esperma até esse mês, no qual foi coletada uma fêmea com ovos. Os dois machos amostrados em dezembro e janeiro já não apresentavam espermatozóides nos ductos deferentes. Nos meses de setembro e outubro também foi verificada atividade secretora nos túbulos do segmento sexual renal dos machos, coincidindo com as fases de espermiogênese e presença de espermatozóides nos ductos deferentes (Figura 14E). Os espécimes coletados entre dezembro e agosto, por sua vez, não apresentam os túbulos do SSR secretores (Figura 56F).

Figura 56 – Cortes histológicos de machos adultos de *Amphisbaena kingi*

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. testículo de macho coletado em janeiro, mostrando túnica albugínea espessa, e túbulos seminíferos com espermatogônias, bem separados por tecido conjuntivo intersticial (MCP 15859); B. testículo de macho coletado em maio, com espermatogônias em fase de multiplicação nos túbulos seminíferos (MCP 16185); C. testículo de macho do mês de julho, apresentando o epitélio seminífero desenvolvido até espermatócitos (MCP 15102); D. testículo em fase espermiogênica, de macho coletado em setembro, mostrando espermatozoides em diferenciação junto à luz dos túbulos seminíferos (*) (MCP 15403); E. corte de ducto deferente e parte do rim do mesmo macho da foto anterior, mostrando a presença de espermatozoides no ducto deferente (*) e túbulos secretores do segmento sexual renal (★); F. rim de macho coletado em agosto, sem atividade secretora no segmento sexual renal (MCP 15337). ept: epitélio do ducto deferente; stg: espermatogônias; ta: túnica albugínea; ti: tecido conjuntivo intersticial. Coloração: hematoxilina/eosina.

Na época em que se verificou presença de espermatozoides nos ductos deferentes em *A. kingi* (setembro e outubro), é possível perceber, no gráfico de dispersão da figura 57, maiores diâmetros dos ductos deferentes, bem como o enovelamento desses ductos. É interessante notar que esse enovelamento já é observado em dois dos quatro espécimes amostrados em agosto, precedendo portanto a fase espermiogênica. Foram examinados histologicamente os ductos deferentes de dois espécimes de agosto, dos quais um apresentava enovelamento e outro não exibia essa característica. Em ambos, não foram observados espermatozoides nos ductos deferentes. Assim, os ductos parecem assumir essa conformação pouco antes de receber espermatozoides. A variação nos diâmetros dos ductos deferentes, observada no gráfico de dispersão desses valores e no diagrama boxplot que os separa por estação (Figura 58), no entanto, não representa diferença de média significativa entre os níveis do fator segundo ANOVA ($p = 0,530$) ou Kruskal-Wallis ($p = 901$).

Figura 57 – Gráfico de dispersão dos dados de diâmetro dos ductos deferentes de machos adultos de *Amphisbaena kingi*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 58 – Diagrama boxplot dos dados diâmetro dos ductos deferentes de *Amphisbaena kingi* adultos, organizados por estações do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes

Apesar de ter sido observada uma fase de hipertrofia e atividade secretora no segmento sexual renal de *A. kingi*, essa variação não se reflete nas medidas de comprimento e diâmetro dos rins dos espécimes. Os dados de comprimento do rim, por não apresentarem variâncias homogêneas, tiveram a variação entre as estações do ano analisada por meio do teste de Kruskal-Wallis, que resultou em um valor p não significativo ($p = 0,581$). Os diâmetros dos rins, por sua vez, foram analisados por meio de ANOVA, que também resultou em um valor p acima do valor crítico ($p = 0,503$). Por outro lado, no gráfico de dispersão dos dados de diâmetro dos rins (Figura 59), é possível notar um discreto aumento nessas medidas entre agosto e outubro. O gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear entre os dados de comprimento dos rins e de comprimento rostro-cloacal (Figura 60), por sua vez, mostra apenas três valores destacados dos demais, em maio, agosto e outubro, o que não deve estar relacionado ao ciclo de atividade secretora do SSR, já que o mesmo encontra-se inativo nos espécimes de maio e agosto.

Figura 59 – Gráfico de dispersão dos dados de diâmetro dos rins de machos adultos de *Amphisbaena kingi*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 60 – Gráfico de dispersão dos dados de comprimento dos rins de machos adultos de *Amphisbaena kingi*, segundo as datas de coleta dos espécimes

As fêmeas de *A. kingi* não apresentaram atividade secretora nos túbulos da região equivalente ao segmento sexual renal, tampouco variação significativa nas medidas de comprimento e diâmetro dos rins, segundo ANCOVA ($p = 0,797$ e $p = 0,216$, respectivamente).

O quadro 5 resume as características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *A. kingi*, inferidas a partir dos dados apresentados.

Quadro 5 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *Amphisbaena kingi*, inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos

Sazonalidade do ciclo reprodutivo	Machos	Sazonal
	Fêmeas	Sazonal, possivelmente bienal
Repouso testicular		Dezembro a janeiro (verão)
Desenvolvimento do epitélio seminífero		Maio a julho (outono)
Espermiogênese		Agosto a outubro (inverno e primavera)
Espermatozóides nos ductos deferentes		Setembro e outubro (final do inverno e primavera)
Segmento sexual renal		Setembro e outubro (final do inverno e primavera)
Crescimento folicular		Dados insuficientes
Ovos		Novembro e janeiro (primavera e verão)

4.1.6 *Amphisbaena mertensi*

Entre os 101 espécimes de *Amphisbaena mertensi* examinados neste estudo, 38 eram imaturos (18 fêmeas, 15 machos e 5 cujo sexo não pôde ser identificado) e 5 não tinham sua data de coleta registrada. O menor macho adulto amostrado apresentava 277 mm de CRC, e a menor fêmea adulta, 260 mm. Foram, então, utilizados para as análises de ciclo reprodutivo 27 fêmeas e 31 machos adultos, provindos de 36 diferentes localidades do sul, sudeste e centro-oeste brasileiros. Como se observa nos mapas da figura 61, a maior parte dessas localidades se insere no bioma de Mata Atlântica, nas ecorregiões de Floresta Atlântica do

Alto Paraná, Florestas Costeiras da Serra do Mar e Mata de Araucárias. Três localidades do estado de São Paulo estão em região de transição entre Cerrados e Mata Atlântica, e outras quatro localidades dos estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso estão em região de Cerrados. No entanto, pôde ser analisado apenas um número muito reduzido de espécimes adultos provindos dessas quatro localidades do Centro-oeste e Minas Gerais (1 macho do Parque Nacional das Emas, em Goiás, 2 machos de Santo Antônio do Leverger, em Mato Grosso, 1 macho de Campo Novo dos Parecis, também em Mato Grosso, e uma fêmea de Araxá, Minas Gerais).

Figura 61 – Localidades de coleta dos espécimes de *Amphisbaena mertensi* adultos amostrados, e sua distribuição nos biomas e ecorregiões brasileiros

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

No caso das fêmeas, não foi necessário separar na análise a única fêmea coletada em região de Cerrado, em Minas Gerais, uma vez que essa se encontrava em vitelogênese primária, com folículos de até 2,45 mm, e foi coletada em abril, mês no qual outras duas fêmeas em vitelogênese primária foram também amostradas. Portanto, esse espécime não trouxe informações destoantes dos espécimes de Mata Atlântica, que pudessem comprometer as análises.

O gráfico de dispersão da figura 62 mostra a distribuição, ao longo do ano, dos comprimentos do maior folículo medido em cada fêmea, segundo as datas de coleta dos espécimes, e evidencia a falta de dados de fêmeas em estágio avançado de vitelogênese secundária. À exceção de dois espécimes nos quais foram observados ovos nos ovidutos, todas as fêmeas amostradas encontravam-se em vitelogênese primária ou no início da vitelogênese secundária, com folículos de até 9 mm. Não é possível, portanto, a partir desse conjunto de dados, caracterizar o padrão de desenvolvimento folicular nessa espécie quanto à sazonalidade ou assazonalidade, ou quanto à época em que se desenrola a fase de maior deposição de vitelo, precedendo a ovulação.

Figura 62 – Gráfico de dispersão das medidas de comprimento do maior folículo ou ovo medido em cada fêmea adulta de *Amphisbaena mertensi*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Ainda no gráfico da figura 62, nota-se o registro de duas fêmeas com ovos nos ovidutos, em junho e outubro, portanto com quatro meses de diferença entre si. A primeira foi coletada em 10 de junho de 1986 em Campo Mourão (PR), ao passo que a segunda proveio de Botucatu (SP), e foi coletada em 27 de outubro de 1982. Ambas as localidades estão incluídas na ecorregião da Floresta Atlântica do Alto Paraná, em clima subquente superúmido (em Campo Mourão) ou úmido (em Botucatu) (NIMER, 1979). Essa diferença de quatro meses e meio entre as duas épocas de coleta pode se dever a uma diferença no ciclo reprodutivo das fêmeas de uma e outra região, à retenção dos ovos nos ovidutos, a um período de estocagem de esperma nos ovidutos, ou ainda a um erro no registro da data de coleta de um dos espécimes.

Histologicamente, não puderam ser observadas variações sazonais na morfologia dos ovidutos, entre as fêmeas em vitelogênese primária e secundária. Nesses indivíduos, o endométrio do oviduto médio é formado por um epitélio simples, cúbico, e por uma lâmina basal de tecido conjuntivo que, em algumas fêmeas, apresenta pequenas glândulas (Figura 63A). Externo ao endométrio está o miométrio. Na porção posterior do oviduto, essa estrutura geral se mantém, mas são observadas dobras no endométrio (Figura 63B). Já no oviduto anterior, diferente das outras regiões do ducto, o epitélio é colunar (Figura 63C).

Os ovidutos das fêmeas que apresentavam ovos não se encontravam em condições satisfatórias para análise histológica, mas ainda assim foi possível observar, no oviduto médio, a presença de glândulas ocupando toda a lâmina basal do endométrio. Na porção anterior do oviduto desses espécimes, observou-se ainda a presença de muitas dobras no epitélio (Figura 63D).

Figura 63 – Cortes histológicos de oviduto de *Amphisbaena mertensi* adultas

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. oviduto médio de fêmea coletada em junho (MHNCI 445); B. oviduto posterior de espécime coletado em março (MTR 9996); C. oviduto anterior da mesma fêmea da foto B; D. oviduto anterior de fêmea grávida, coletada em junho (MHNCI 3866). ept: epitélio; lp: lâmina própria; m: miométrio. Coloração: hematoxilina/eosina.

Entre os machos, a maior parte dos espécimes proveio de localidades de Mata Atlântica ou áreas de transição desse bioma com o Cerrado, nos estados de São Paulo (21 indivíduos) e Paraná (6 espécimes). Foram ainda amostrados 4 espécimes nos cerrados do centro-oeste do país, em Goiás e Mato Grosso. Tendo em vista essa distribuição dos espécimes, as análises estatísticas foram realizadas para dois grupos diferentes: um apenas com os dados de espécimes de regiões de Mata Atlântica e transição entre esse bioma e o Cerrado (coletados nos estados de São Paulo e Paraná), e outro reunindo todos os dados, inclusive dos espécimes do centro-oeste. Uma vez que a maior parte dos sujeitos amostrais foi coletada em área de Mata Atlântica, para as análises de variação das medidas de testículos, rins e ductos deferentes, esses dados foram divididos em quatro estações do ano (verão, outono, inverno e primavera).

Em ambos os grupos amostrais, todas as variáveis analisadas estão significativamente relacionadas ao CRC, segundo análise de regressão linear, e por isso a diferença entre as médias obtidas para cada estação do ano foi testada por meio de ANCOVA, tendo como covariável o comprimento rostro-cloacal. Também nos dois grupos amostrais, os valores de volume testicular não apresentaram distribuição normal, segundo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,001$, para a amostra da Mata Atlântica, e $p = 0,001$ para a amostra completa), mas se adequaram à hipótese de normalidade da distribuição quando submetidos a transformação com logaritmo natural ($p = 0,268$, para a amostra da Mata Atlântica, e $p = 0,195$ para a amostra completa). Todas as variáveis, em ambos os grupos amostrais, atenderam ao pressuposto de igualdade de variâncias, segundo o teste de Levene.

Os valores p resultantes das análises de regressão linear e de comparação de médias, que serão comentados a seguir, encontram-se resumidos na tabela 7.

Tabela 7 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de *Amphisbaena mertensi*

Grupo amostral	Variável	N	Regressão linear		N (verão/outono/ inverno/ primavera)	ANCOVA		K-W p
			p	R ²		p	F	
Mata Atlântica	Volume testicular	28	0,001	0,339	6/7/4/10	< 0,001*	11,714*	0,001
	Diâmetro do ducto deferente	28	0,016	0,204	6/7/4/10	0,127	2,106	0,220
	Comprimento do rim	22	< 0,001	0,583	5/6/3/7	0,909	0,179	0,988
	Diâmetro do rim	22	0,004	0,348	5/6/3/7	0,078	2,699	0,244
Mata Atlântica e Cerrado	Volume testicular	32	< 0,001	0,340	8/7/6/10	< 0,001*	17,641*	< 0,001
	Diâmetro do ducto deferente	32	0,022	0,164	8/7/6/10	0,058	2,811	0,168
	Comprimento do rim	26	< 0,001	0,529	7/6/5/7	0,597	0,640	0,922
	Diâmetro do rim	26	0,001	0,355	7/6/5/7	0,025	3,833	0,190

K-W: teste de Kruskal-Wallis.

Os índices p considerados significativos ($p < 0,05$) estão em negrito.

*A variável não tem distribuição normal, e por isso foram usados para análise os dados submetidos a transformação logarítmica (ln).

Nos gráficos de dispersão dos resíduos da regressão linear entre os valores de volume testicular e comprimento rostro-cloacal, mostrados nas figuras 64 e 65, nota-se nos dois grupos amostrais um aumento desses valores entre junho e dezembro - durante o inverno e primavera. Esse aumento, bem evidente também no boxplot que separa os dados por estações do ano (Figura 66), é significativo segundo ANCOVA, para ambos os grupos amostrais ($p = 0,001$, para a amostra da Mata Atlântica, e $p < 0,001$ para a amostra completa). Os testes post-hoc de Tukey e Games-Howell apontaram diferença significativa entre a média obtida na

primavera e as médias do verão e outono. O teste de Tukey apontou, ainda, diferença significativa entre os valores de volume testicular do inverno e do verão.

Figura 64 – Gráficos de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal de *Amphisbaena mertensi* adultos, segundo as datas de coletas dos espécimes, considerando-se a amostra de Mata Atlântica

Figura 65 – Gráficos de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal de *Amphisbaena mertensi* adultos, segundo as datas de coletas dos espécimes, considerando-se a amostra completa, com dados de Mata Atlântica e Cerrado

Figura 66 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular de *Amphisbaena mertensi* adultos, separados por estações do ano, de acordo com a data de coleta dos espécimes

Puderam ser coletadas amostras para processamento histológico de 21 machos adultos, sendo 19 de regiões de Mata Atlântica e apenas dois de Cerrados, do estado de Mato Grosso. A amostra de regiões de Mata Atlântica abrange 8 meses do ano, não havendo amostragem para os meses de fevereiro, julho, agosto e setembro. Os machos de localidades de Cerrado, por sua vez, foram coletados em março e setembro. Por meio de análise de microscopia de luz, observou-se que o desenvolvimento do epitélio seminífero desses machos alcança o estágio de espermatócitos entre maio e junho, época próxima àquela na qual começa a observação de maiores volumes testiculares, que se dá a partir de junho (Figura 67A). No final de junho, um dos machos amostrados já havia iniciado sua fase espermiogênica (Figura 67B). Dos meses de julho e agosto, não foram obtidas amostras em boas condições para análise histológica, e de setembro, apenas um macho da região de Cerrado, que se encontrava espermiogênico, pôde ser amostrado. Nos meses de outubro e novembro, foram amostrados quatro machos ainda em fase espermiogênica, com espermatozoides em formação no epitélio seminífero e outros já soltos na luz dos túbulos seminíferos. A fase espermiogênica dessa espécie se desenrola, portanto, entre junho e novembro, coincidindo com o período no qual foram observados maiores volumes testiculares na amostra. Também em outubro e novembro

foram observados espermatozóides nos ductos deferentes desses machos, em meio a gotículas de secreção. Os espécimes amostrados no mês de dezembro já não têm espermatozóides participando do epitélio seminífero, mas apenas soltos na luz dos túbulos. Esses machos ainda mantêm espermatozóides e secreção nos ductos deferentes. Já em janeiro, os cinco espécimes amostrados para análise histológica apresentavam apenas espermatogônias nos túbulos seminíferos (Figura 67C), e tinham seus ductos deferentes vazios. Assim, a cópula em *A. mertensi* de regiões de Mata Atlântica ocorre possivelmente em dezembro, entre o final da primavera e início do verão. Todos os sete machos amostrados entre janeiro e abril, além de um espécime do mês de maio, apresentaram apenas espermatogônias nos túbulos seminíferos, sugerindo a ocorrência de uma fase de repouso reprodutivo nesse período. Entre outubro e dezembro, em todos os machos espermiogênicos e com presença de espermatozóides nos ductos deferentes, foi constatada atividade secretora no segmento sexual renal, diferente daqueles cujo epitélio seminífero apresentava desenvolvido até o estágio de espermátocitos ou início da espermiogênese (Figura 67D).

Os dois espécimes de região de Cerrado para os quais se obtiveram amostras para processamento histológico foram coletados nos meses de março e setembro. Ambos apresentaram-se espermiogênicos, com presença de espermatozóides e secreção nos ductos deferentes, e com o SSR em atividade secretora. Se por um lado o macho coletado em setembro se encontrava na mesma fase reprodutiva dos espécimes observados em outubro e novembro em região de Mata Atlântica, o espécime coletado em março se apresentava em fase espermiogênica, que só foi observada nos espécimes de Mata Atlântica a partir de junho. Assim, há evidência de que o ciclo de *A. mertensi* de populações de regiões de Cerrado pode diferir do ciclo observado em espécimes de regiões de Mata Atlântica.

Figura 67 – Cortes histológicos de machos adultos de *Amphisbaena mertensi*, de localidades do bioma de Mata Atlântica

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. testículo de espécime coletado em maio, mostrando espermatogônias e espermatócitos (CRIB 403); B. testículo de espécime coletado em junho, em fase espermiogênica (CRIB 408); C. testículo de macho coletado em janeiro, mostrando apenas espermatogônias nos túbulos seminíferos (CRIB 402); D. segmento sexual renal em fase secretora, de macho coletado em novembro (MHNCI 1395). Coloração: hematoxilina/eosina.

Os gráficos de dispersão dos resíduos da regressão linear entre os valores de diâmetro do ducto deferente e de comprimento rostro-cloacal, mostrados nas figuras 68 e 69, não mostram variações evidentes nessa medida ao longo do ano, sejam considerados apenas os espécimes de Mata Atlântica ou a amostra completa. A inexistência de variação significativa entre as estações do ano é confirmada por ANOVA, para os dois grupos amostrais ($p = 0,127$, para a amostra da Mata Atlântica, e $p < 0,058$ para a amostra completa). Por outro lado, os mesmos gráficos de dispersão mostram a ocorrência de ductos deferentes enovelados nos mesmos meses em que foi observada a presença de espermatozóides nesses ductos, com exceção de um espécime em janeiro. Foram analisados sob microscopia de luz os ductos deferentes de quatro espécimes com os ductos enovelados, coletados entre setembro e dezembro, e em todos se observaram espermatozóides e secreção na luz desses órgãos. O

espécime de janeiro, por outro lado, apesar de ter os ductos enovelados, mostrou apenas gotículas de secreção, não tendo sido observados espermatozóides. Todos os demais espécimes amostrados para análise histológica e cujos ductos não apresentavam espermatozóides, não exibiam esse aspecto enovelado dos mesmos.

Figura 68 – Gráficos de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do ducto deferente e comprimento rostro-cloacal de machos de *Amphisbaena mertensi* adultos, segundo as datas de coletas dos espécimes, considerando-se a amostra de Mata Atlântica

Figura 69 – Gráficos de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do ducto deferente e comprimento rostro-cloacal de machos de *Amphisbaena mertensi* adultos, segundo as datas de coletas dos espécimes, considerando-se a amostra completa, incluindo espécimes de Mata Atlântica e Cerrado

Apesar de ter sido observada, nos espécimes de Mata Atlântica, atividade secretora no segmento sexual renal apenas entre outubro e dezembro, nos espécimes espermiogênicos e com espermatozoides nos ductos deferentes, essa variação sazonal não se reflete nos valores de comprimento e diâmetro dos rins (Figuras 70 e 71). A análise de ANCOVA não aponta diferenças significativas entre as médias dessas variáveis entre as estações ($p = 0,909$, para o comprimento do rim, e $p = 0,078$, para o diâmetro do mesmo). Por outro lado, quando considerados também os dados dos espécimes de Cerrado, o diâmetro dos rins varia significativamente segundo ANCOVA ($p = 0,025$) (Figura 72). No entanto, como foram observadas diferenças de fase espermiogênica entre espécimes do Cerrado e de Mata Atlântica, esse dado deve ser visto com cautela.

Figura 70 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre comprimento do rim e comprimento rostro-cloacal de machos de *Amphisbaena mertensi* adultos, segundo as datas de coletas dos espécimes, considerando-se a amostra de Mata Atlântica

Figura 71 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do rim e comprimento rostro-cloacal de machos de *Amphisbaena mertensi* adultos, segundo as datas de coletas dos espécimes, considerando-se a amostra de Mata Atlântica

Figura 72 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do rim e comprimento rostro-cloacal de machos de *Amphisbaena mertensi* adultos, segundo as datas de coletas dos espécimes, considerando-se a amostra completa (Mata Atlântica e Cerrado)

As fêmeas da espécie não apresentaram qualquer variação significativa, ao longo do ano, nas medidas de comprimento e diâmetro dos rins, tampouco a histologia desses órgãos variou na região correspondente ao SSR.

As características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *A. mertensi* que puderam ser inferidas a partir dos dados acima expostos encontram-se resumidas no quadro 6.

Quadro 6 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *Amphisbaena mertensi*, inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos

Sazonalidade do ciclo reprodutivo	Machos	Sazonal
	Fêmeas	Dados insuficientes
Repouso testicular		Janeiro a abril (verão e outono)
Desenvolvimento do epitélio seminífero		Maio e junho (outono)
Espermio gênese		Final de junho a novembro (inverno e primavera)
Espermatozóides nos ductos deferentes		Outubro a dezembro (primavera)
Segmento sexual renal		Outubro a dezembro (primavera)
Crescimento folicular		Dados insuficientes
Ovos		Junho e outubro (inverno e primavera)

4.1.7 *Amphisbaena microcephala*

Entre os 112 espécimes de *Amphisbaena microcephala* que foram analisados, 22 eram imaturos (12 fêmeas, 3 machos e 7 cujo sexo não pôde ser identificado). Outros 5 machos e 3 fêmeas não tinham os órgãos bem preservados ou havia dúvida quanto ao registro da data de coleta, e por isso foram utilizados somente para análises de dimorfismo sexual. Assim, 39 fêmeas e 44 machos adultos puderam ser utilizados para as análises de ciclo reprodutivo. O menor macho adulto amostrado apresentava 232 mm de CRC, e a menor fêmea adulta, 243 mm. Esses espécimes provieram de 21 diferentes localidades, todas no bioma da Mata Atlântica (ecorregiões de Florestas Costeiras da Serra do Mar, Floresta Atlântica do Alto Paraná e Mata de Araucárias) ou na transição desse com o Cerrado (Figura 73). Levando em conta essa distribuição, para as análises de variação nas medidas das gônadas e ductos genitais, esses dados foram separados em quatro estações do ano: verão, outono, inverno e primavera.

Figura 73 – Localidades de coleta dos espécimes de *Amphisbaena microcephala* adultos amostrados, e sua distribuição nos biomas e ecorregiões brasileiros

Fonte: SANTOS, L. C. 2013

Entre as fêmeas de *A. microcephala* foram observados folículos em vitelogênese primária ou início da vitelogênese secundária ao longo de todo o ano, como se pode observar no gráfico de dispersão dos valores de comprimento do maior folículo ou ovo medido em cada fêmea, segundo as datas de coleta dos espécimes (Figura 74). Entre os meses de janeiro e julho, todas as fêmeas amostradas apresentavam folículos de até 7 mm. Entre agosto e dezembro, percebe-se o crescimento dos folículos em vitelogênese secundária, que atingem comprimentos de até 9,5 mm em agosto, 18,5 mm em outubro e 25,7 mm em dezembro. Esse período de crescimento folicular é seguido por dois registros de fêmeas com ovos, sendo um de 11 de dezembro e outro de 17 de janeiro. A diferença de pouco mais de um mês entre os dois registros de fêmeas com ovos pode se dever à existência de um intervalo no qual pode ocorrer a ovulação e fecundação, ou a um período de retenção dos ovos nos ovidutos. A observação de fêmeas em vitelogênese primária ao longo de todo o ano, inclusive na fase em que se observam fêmeas em estágio avançado de deposição de vitelo ou fêmeas grávidas, sugere a ocorrência de um ciclo reprodutivo ao menos bienal nessa espécie.

Figura 74 – Gráfico de dispersão dos valores de comprimento do maior folículo ou ovo medido em cada *Amphisbaena microcephala* adulta amostrada, segundo as datas de coleta dos espécimes

Sob microscopia de luz, observa-se que o oviduto dessas fêmeas é formado pelo miométrio e pelo endométrio, esse por sua vez composto por um epitélio simples e uma lâmina basal de tecido conjuntivo. A porção média do oviduto pode apresentar glândulas de origem epitelial no tecido conjuntivo da lâmina basal (Figura 75A). Nas fêmeas em fase avançada da vitelogênese secundária, essas glândulas são bem evidentes, e ocupam grande parte da lâmina basal do endométrio. A figura 75B mostra uma dessas fêmeas, coletada em dezembro e apresentando folículos de até 25,68 mm, e permite observar muitas dessas glândulas, embora seu estado de fixação tenha prejudicado a visualização dessas estruturas. Nas fêmeas com ovos nos ovidutos, as glândulas do endométrio apresentam-se secretoras. Adicionalmente, nessa fase, os espécimes apresentam estruturas semelhantes a glândulas também na parte posterior do infundíbulo. As células dessas estruturas, no entanto, não são secretoras, mas ciliadas (Figura 75C). Os túbulos assim formados, também observados em fêmeas de *A. infraorbitale*, são provavelmente túbulos de estocagem de esperma, estruturas já conhecidas em outros Squamata (FOX, 1977; SAINT-GIRONS, 1985; BLACKBURN 1998; SIEGEL et al., 2011). Outra variação observada na região da tuba nas fêmeas grávidas é a atividade secretora nas células epiteliais dessa região, e que também pode ser observada na figura 75C. Nas demais fêmeas, por sua vez, não foi observada produção de secreção no epitélio da tuba (Figura 75D).

Figura 75 – Cortes histológicos ovidutos de fêmeas adultas de *Amphisbaena microcephala*

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. oviduto médio de fêmea coletada em maio, com folículos secundários de até 5,3 mm, mostrando pequenas glândulas no endométrio (CRIB 641); B. oviduto médio de fêmea coletada em dezembro, com folículos secundários de até 25,68 mm, mostrando endométrio com muitas glândulas (*) (CRIB 339); C. infundíbulo posterior (tuba) de espécime coletado em dezembro, e que apresentava ovos nos ovidutos, mostrando epitélio secretor e túbulos com células ciliadas (setas) (UFMT 3550); D. infundíbulo posterior da mesma fêmea da foto A. ept: epitélio; gl: glândulas; lp: lâmina própria. Coloração: hematoxilina/eosina.

As variáveis utilizadas na caracterização do ciclo reprodutivo de machos (volume testicular, diâmetro do ducto deferente e comprimento e diâmetro do rim) foram submetidas a análises de regressão linear tendo como variável independente o comprimento rostro-cloacal. Todas as variáveis em questão mostraram-se significativamente relacionadas ao CRC, motivo pelo qual a variação das mesmas entre as estações do ano foi testada por meio de ANCOVA, e os gráficos de dispersão apresentados a seguir mostram os valores dos resíduos dessas análises de regressão.

No gráfico de dispersão dos resíduos da regressão entre CRC e volume testicular, alguns dados chamam a atenção: uma medida muito maior do que as demais em maio, e três medidas, também de valores altos, ligeiramente destacadas das demais entre setembro e

novembro (Figura 76). O ponto que se destaca em maio se refere ao volume do testículo esquerdo medido no espécime CRIB 355. Além de apresentar um volume evidentemente maior do que os testículos dos demais machos coletados naquele mesmo mês, foi observado por meio de análise histológica que esse espécime se encontrava em uma fase espermatogênica diferente dos outros machos amostrados até aquele mês. O espécime em questão apresentava espermatogônias, espermatócitos primários e secundários, espermátides e até mesmo alguns espermatozóides. Como será detalhado logo adiante, entre os demais machos, só foi observado tal estágio espermatogênico em setembro e outubro, sendo que durante todo o primeiro semestre os demais espécimes apresentavam apenas espermatogônias ou, em alguns casos, espermatócitos primários. Isso pode se dever a um erro no registro da data de coleta do espécime, ou a uma característica do ciclo reprodutivo da espécie que não pode ainda ser acessada com o número amostral aqui obtido. Considerando esse dado discrepante, as análises estatísticas para estudo do ciclo reprodutivo dessa espécie foram executadas excluindo os dados do espécime CRIB 355.

Outra peculiaridade observada no gráfico de dispersão da figura 76 foi, como já mencionado, a ocorrência de três valores destacadamente altos entre setembro e novembro, sendo que dois desses valores aparecem como outliers no diagrama boxplot desses dados (Figura 77). Esses três valores correspondem a dados de espécimes coletados em localidades do estado do Paraná. Os dois maiores volumes testiculares no primeiro semestre (desconsiderado o dado de CRIB 355) também são de espécimes do Paraná. Por isso, foi realizado teste t comparando as médias dos volumes testiculares dos espécimes coletados em São Paulo e no Paraná. O que se observou foi que as amostras não diferem significativamente ($p = 0,09$). Apesar dessa aparente diferença nos volumes testiculares nos espécimes da região Sul, nota-se pelos gráficos de dispersão das figuras 78 e 79, que separam os dados dos dois estados, que ocorre em ambas as amostras um aumento nesses volumes na mesma época, entre agosto e novembro. Ao mesmo tempo, observou-se por meio de análises histológicas que os espécimes de ambas as regiões se encontravam em fases espermatogênicas coincidentes. Assim, é possível que haja uma diferença no tamanho dos órgãos entre os espécimes dessas duas regiões, sem que isso reflita necessariamente diferenças no ciclo reprodutivo dessas populações. Ainda assim, considerando o efeito dessa possível diferença no tamanho dos testículos nas análises estatísticas, optou-se por realizá-las duas vezes, uma considerando apenas os dados dos espécimes de São Paulo, e outra considerando o conjunto dos dados. Os espécimes do Paraná não foram analisados separadamente devido a seu baixo número amostral (9 machos adultos).

Figura 76 – Gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal, dos espécimes machos adultos de *Amphisbaena microcephala* (amostra completa)

Figura 77 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular de *Amphisbaena microcephala* adultos, separados por estação do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes (amostra completa)

Figura 78 – Gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal, dos espécimes machos adultos de *Amphisbaena microcephala* coletados em localidades do estado de São Paulo

Figura 79 – Gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal, dos espécimes machos adultos de *Amphisbaena microcephala* coletados no estado do Paraná

Os dados de volume testicular foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene, para verificação das hipóteses de normalidade e homocedasticidade das amostras. Em ambos os grupos amostrais (espécimes de São Paulo e amostra completa), a distribuição dos dados não se mostrou normal ($p < 0,001$ para ambas as amostras), o que pôde ser corrigido com transformação logarítmica dos dados ($p = 0,491$ para a amostra de São Paulo, e $p = 0,338$ para a amostra completa). A homogeneidade de variâncias, por outro lado, foi verificada apenas para a amostra de São Paulo ($p = 0,164$). A amostra completa tem variâncias desiguais ($p = 0,164$), mesmo após transformação logarítmica. Por isso, o teste de Kruskal-Wallis foi também considerado para analisar a diferença entre as médias das estações nesse caso. As demais variáveis analisadas (diâmetro do ducto deferente, comprimento e diâmetro dos rins) têm distribuição normal e variâncias homogêneas.

Nos gráficos de dispersão das figuras 76, 78 e 79, nota-se um aumento no volume dos testículos já a partir do final do inverno, em julho (o que pode ser bem observado no boxplot da Figura 83), até um pico bem marcado em outubro. Há então, imediatamente após esse pico e ainda na primavera, uma queda no volume dos testículos, o que fica também evidenciado pela média da estação no boxplot da figura 77. A existência desse pico nítido e bem marcado sugere a ocorrência de uma fase curta de espermiogênese, seguida então pela queda do volume testicular. As análises de ANCOVA, no entanto, não apontaram diferença significativa entre as médias dessa variável por estação, tanto entre os espécimes do estado de São Paulo quanto na amostra completa ($p = 0,215$ e $p = 0,116$, respectivamente). Os valores p obtidos das análises de comparação de média entre as estações do ano para todas as variáveis a serem aqui apresentadas, bem como das análises de regressão linear entre essas variáveis e o CRC, estão reunidos na tabela 8.

Tabela 8 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de *Amphisbaena microcephala*

Grupo amostral	Variável	N	Regressão linear		N (verão/outono/ inverno/ primavera)	ANCOVA		K-W p
			p	R ²		p	F	
São Paulo	Volume testicular	34	0,024	0,149	6/3/4/21	0,215*	1,581*	0,118
	Diâmetro do ducto deferente	34	0,028	0,142	6/3/4/21	0,083	2,457	0,025
	Comprimento do rim	33	<0,001	0,402	6/3/4/20	0,876	0,228	0,687
	Diâmetro do rim	33	<0,001	0,488	6/3/4/20	0,431	0,948	0,179
Amostra total	Volume testicular	43	0,001	0,247	6/6/5/26	0,116*	2,101*	0,077**
	Diâmetro do ducto deferente	39	0,017	0,141	6/4/4/25	0,099	2,252	0,05
	Comprimento do rim	33	<0,001	0,402	6/3/4/20	0,876	0,228	0,687
	Diâmetro do rim	33	<0,001	0,488	6/3/4/20	0,431	0,948	0,179

K-W: teste de Kruskal-Wallis.

Os índices p considerados significativos ($p < 0,05$) estão em negrito.

*A variável não tem distribuição normal, e por isso foram usados para análise os dados submetidos a transformação logarítmica (ln).

** A amostra não apresenta distribuição homogênea das variâncias, e por isso o teste de Kruskal-Wallis é mais confiável para a análise de variação das médias.

O registro de maiores volumes testiculares entre o inverno e a primavera, e de menores valores dessa variável no verão e outono, coincidem com o ritmo de desenvolvimento da linha seminal observado por meio de análises histológicas dos testículos. Em *A. microcephala*, observou-se que os testículos encontram-se em repouso no verão e começo do outono (entre janeiro e abril). Nesses espécimes, os túbulos seminíferos apresentam apenas espermatogônias, e há abundante tecido intersticial entre os túbulos (Figura 80A). O desenvolvimento do epitélio seminífero tem início na segunda metade do outono, em maio, quando são observados espermatócitos primários e secundários nos túbulos seminíferos. A

fase espermiogênica, por sua vez, tem lugar em setembro e outubro, no começo da primavera (Figura 80B), época a partir da qual também passam a ser observados espermatozóides nos ductos deferentes. Nessa fase, o epitélio dos ductos deferentes apresenta-se secretor (Figura 80C). A produção de espermatozóides é observada apenas em setembro e outubro, sendo que já em novembro e dezembro a linha seminal está desestruturada, exibindo apenas espermatogônias e poucos espermatozóides soltos na luz dos túbulos seminíferos (Figura 80D). Por outro lado, os espermatozóides se mantêm estocados nos ductos deferentes até dezembro, mês no qual foi observada uma fêmea com ovos nos ovidutos. Já em janeiro, esses ductos estão vazios, sugerindo que a cópula nessa espécie deve ocorrer no mês de dezembro.

O segmento sexual renal, nessa espécie, permanece hipertrofiado e secretor de setembro a novembro, de modo que essa fase se inicia juntamente com o período espermiogênico e se mantém até o final da fase de estocagem de esperma nos ductos deferentes. Nessa fase, as células do epitélio dos túbulos néfricos da região do SSR são colunares, de núcleo basal, e apresentam a sua porção apical repleta de secreção (Figura 80E). Em dezembro, essas células já não se apresentam secretoras e seu núcleo é central (Figura 80F).

Para comparação, os rins de fêmeas também foram analisados histologicamente, e não apresentaram variações morfológicas ou atividade secretora na região correspondente ao SSR, ao longo do ano.

Figura 80 – Cortes histológicos de machos adultos de *Amphisbaena microcephala*

Fonte: SANTOS. L. C., 2013

A. testículo de macho coletado em março, mostrando apenas espermatogônias nos túbulos seminíferos, que por sua vez estão bem separados por tecido intersticial (CRIB 387); B. testículo de espécime em fase espermiogênica, coletado em outubro (CRIB 342); C. ducto deferente de macho coletado em setembro, mostrando espermatozoides na luz, epitélio secretor e gotículas de secreção (*); D. testículo de macho coletado em dezembro, entrando em fase de repouso reprodutivo, exibindo espermatogônias e o epitélio seminífero já desestruturado (CRIB 581); E. rim de espécime coletado em outubro mostrando o segmento sexual renal com túbulos hipertrofiados e secretores e, à esquerda, túbulos néfricos de região adjacente ao SSR (CRIB 379); F. segmento sexual renal de macho coletado em dezembro, com epitélio não secretor e de núcleos centrais (CRIB 581). Coloração das lâminas A, B, D, E e F: hematoxilina/eosina; coloração da lâmina C: azul de toluidina/fucsina.

Se no gráfico de dispersão dos valores de volume testicular os dados dos espécimes coletados no estado no Paraná se destacaram daqueles da amostra de São Paulo, o mesmo não se observa em relação às medidas de diâmetro do ducto deferente. Como se nota nos gráficos das figuras 81 e 82, de dispersão dos dados de São Paulo e da amostra completa, não há valores evidentemente destacados em relação aos demais. Da mesma forma, no diagrama boxplot dos dados da amostra completa (Figura 83), não se observa a ocorrência de outliers. Tanto nos gráficos de dispersão quanto no diagrama boxplot, nota-se um aumento nos diâmetros desses ductos entre setembro e novembro (final do inverno e primavera). Esse aumento parece associado à observação de ductos com aspecto enovelado (com exceção de um espécime em julho, que apresentou esse enovelamento mais precocemente). O período em que se observam esse enovelamento e aumento no diâmetro dos ductos coincide com a fase de estocagem de esperma, como exposto acima. A variação observada nos diâmetros, no entanto, não é significativa segundo ANCOVA, tanto para a amostra de São Paulo quanto para a amostra total ($p = 0,083$ e $p = 0,099$, respectivamente).

Figura 81 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do ducto deferente e comprimento rosro-cloacal, em machos adultos de *Amphisbaena microcephala* do estado de São Paulo

Figura 82 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do ducto deferente e comprimento rosro-cloacal, em machos adultos de *Amphisbaena microcephala* dos estado de São Paulo e Paraná

Figura 83 – Diagrama boxplot dos dados de diâmetro do ducto deferente de machos adultos de *Amphisbaena microcephala*, separados por estações do ano segundo as datas de coleta dos espécimes (amostra completa)

As medidas de diâmetro e comprimento dos rins puderam ser obtidas apenas para espécimes de localidades do estado de São Paulo. Apesar de ter sido observada uma fase de hipertrofia e atividade secretora no segmento sexual renal de *A. microcephala*, entre setembro e novembro, essas variações não se refletiram nas medidas de comprimento e diâmetro dos rins dos machos. Nenhuma dessas duas medidas apresentou variação significativa segundo ANCOVA ($p = 0,876$ para comprimento do rim, e $p = 0,431$ para diâmetro do rim), embora a observação dos gráficos de dispersão dos valores de comprimento do rim sugira uma redução dos mesmos durante o outono (entre abril e junho), precedendo portanto a fase de hipertrofia e atividade secretora (Figuras 84 e 85).

Figura 84 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do ducto deferente e comprimento do rim, em machos adultos de *Amphisbaena microcephala* do estado de São Paulo

Figura 85 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos da regressão linear entre diâmetro do ducto deferente e diâmetro do rim, em machos adultos de *Amphisbaena microcephala* do estado de São Paulo

O quadro 7 resume as características do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de *A. microcephala*, inferidas com base nos dados apresentados.

Quadro 7 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *Amphisbaena microcephala*, inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos

Sazonalidade do ciclo reprodutivo	Machos	Sazonal
	Fêmeas	Sazonal, pelo menos bienal
Repouso testicular		Novembro a abril (primavera ao início do outono)
Desenvolvimento do epitélio seminífero		Maio a agosto (outono e inverno)
Espermio gênese		Setembro e outubro (primavera)
Espermatozóides nos ductos deferentes		Setembro a dezembro (primavera)
Segmento sexual renal		Setembro a novembro (primavera)
Crescimento folicular		Agosto a dezembro (inverno e primavera)
Ovos		Dezembro e janeiro (primavera e verão)

4.1.8 *Amphisbaena munoai*

Dentre os 189 espécimes de *Amphisbaena munoai* amostrados, 34 eram imaturos (11 fêmeas, 5 machos e 18 cujo sexo não pôde ser identificado), e 3 tinham os órgãos danificados, dificultando a medição das gônadas e ductos genitais. Por isso, 64 fêmeas e 88 machos puderam ser utilizados para análise do ciclo reprodutivo da espécie. O menor macho amostrado apresentava 106 mm de CRC, e a menor fêmea, 110 mm. Os espécimes amostrados provieram de 5 diferentes localidades, todas do bioma dos Pampas (ecorregião de Campos Sulinos), com clima mesotérmico brando, temperado (NIMER, 1979) (Figura 86). Por isso, para as análises de variação das medidas de gônadas, ductos genitais e rins ao longo do ano, esses dados foram separados em quatro estações do ano: verão, outono, inverno e primavera.

No gráfico de dispersão dos valores de comprimento do maior folículo ou ovo medido em cada fêmea, segundo as datas de coleta dos espécimes (Figura 87), nota-se que entre janeiro e maio todas as fêmeas amostradas apresentavam-se em vitelogênese primária ou início da vitelogênese secundária (com folículos de até 3 mm). De junho a setembro, se observam folículos com comprimentos pouco maiores, mas que não alcançam 5 mm de comprimento. Somente entre outubro e novembro esses folículos ultrapassam os 5 mm, atingindo até 16 mm ainda em novembro. Nesse mesmo mês, foram também amostradas as primeiras fêmeas com ovos nos ovidutos, o que se repete também em dezembro. Esse quadro sugere uma fase curta, entre um e dois meses, de depósito intenso de vitelo precedendo a ovulação. Também foram observadas, em novembro e dezembro, três fêmeas em vitelogênese primária ou com folículos secundários de comprimento inferior a 4 mm, o que sugere a possibilidade de um ciclo bienal para as fêmeas da espécie.

Figura 86 – Localidades de coleta dos espécimes de *Amphisbaena munoai* adultos amostrados, e sua distribuição nos biomas e ecorregiões brasileiros

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

Figura 87 – Gráfico de dispersão dos valores de comprimento do maior folículo ou ovo observado em cada fêmea adulta de *Amphisbaena munoai*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Sob microscopia de luz, os ovidutos das fêmeas de *A. munoai* são formados por um endométrio composto de epitélio e lâmina basal de tecido conjuntivo e, mais externamente, pelo miométrio e pela camada serosa. Puderam ser coletadas amostras de ovidutos de 34 fêmeas da espécie, com datas de coleta distribuídas ao longo de todos os meses do ano, e observou-se que todas as fêmeas que apresentavam folículos a partir de 5 mm de comprimento tinham a lâmina própria do endométrio ocupada por glândulas repletas de gotículas de secreção (Figura 88A). Essas estruturas foram, portanto, observadas entre outubro e dezembro, e sua presença em todos os espécimes com folículos variando entre 5 e 16 mm de comprimento é mais uma evidência do rápido crescimento folicular antecedendo a ovulação nessa espécie. Também nessa fase, o epitélio do infundíbulo apresenta células secretoras e dobras no endométrio (Figura 88B). As demais fêmeas, em vitelogênese primária ou com folículos secundários de até 5 mm, apresentam glândulas muito reduzidas ou mesmo ausência de glândulas no endométrio.

Figura 88 – Cortes histológicos de oviduto de *Amphisbaena munoai* fêmea coletada em novembro, com folículos secundários de até 5,5 mm (MCP 12071)

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. oviduto médio, mostrando lâmina basal do endométrio completamente ocupada por glândulas; B. porção posterior do infundíbulo, com dobras no endométrio e células secretoras no epitélio.

Para a análise de variação nas medidas de volume testicular, diâmetro do ducto deferente, e comprimento e diâmetro dos rins, para caracterização do ciclo reprodutivo dos machos, essas variáveis foram submetidas primeiramente a análise de regressão linear com o CRC. Com exceção do diâmetro do ducto deferente, todas as variáveis mostraram-se significativamente relacionadas ao comprimento rostro-cloacal, e por isso a variação das médias desses valores entre as estações foi analisada por meio de ANCOVA, tendo como covariável o CRC. Os valores p obtidos das análises de regressão linear, bem como os resultantes das análises de diferença entre as médias das variáveis por estação do ano, e que serão mostrados a seguir, estão resumidos na tabela 9.

As variáveis foram ainda submetidas a testes de homocedasticidade e igualdade de variâncias, precedendo os testes de ANOVA e ANCOVA. Segundo o teste de Shapiro-Wilk, as distribuições dos dados de comprimento e diâmetro dos rins são compatíveis com uma distribuição normal, mas o mesmo não se verifica em relação às medidas de volume testicular e diâmetro do ducto deferente, mesmo quando esses dados são transformados por logaritmo natural. Por isso, as médias dessas duas últimas variáveis foram analisadas também por meio do teste de Kruskal-Wallis. Da mesma forma, a igualdade de variâncias foi observada somente nas medidas de rins, sendo desiguais as variâncias dos dados de volume testicular e diâmetro do ducto deferente.

Tabela 9 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de *Amphisbaena munoai*

Variável	N	Regressão linear		N (verão/outono/ inverno/primavera)	ANOVA/ ANCOVA		K-W
		p	R ²		p	F	
Volume testicular	87	0,001	0,114	11/20/36/20	<0,001	22,406	<0,001 *
Diâmetro do ducto deferente	85	0,390	0,009	10/20/35/20	<0,001	9,226	<0,001 *
Comprimento do rim	87	<0,001	0,169	10/20/37/20	0,752	0,402	0,513
Diâmetro do rim	87	0,002	0,110	10/20/37/20	<0,001	9,202	0,001

K-W: teste de Kruskal-Wallis.

Os índices p considerados significativos ($p < 0,05$) estão em negrito.

* A amostra não apresenta distribuição normal ou igualdade de variâncias, e por isso o teste de Kruskal-Wallis é mais confiável para a análise de variação das médias.

Como se pode notar no gráfico de dispersão da figura 89, foi observado um aumento contínuo nos volumes dos testículos de janeiro até setembro, quando os mesmos atingem um pico. Esses valores máximos foram registrados, portanto, dois a três meses antes da observação de ovos nos ovidutos das fêmeas, que tem lugar em novembro e dezembro. Logo após o pico em setembro, tem início uma queda nos volumes testiculares, que atingem seus valores mais baixos em dezembro e janeiro. Apenas um espécime, coletado em agosto, apresentou volume testicular destacado dos demais espécimes amostrados no mesmo mês, de modo que o ciclo reprodutivo parece ser bastante sincrônico entre os indivíduos da espécie. O diagrama boxplot da figura 90 separa os dados obtidos por estações do ano, segundo as datas de coleta dos espécimes, e evidencia a ocorrência de menores volumes testiculares no verão (entre 22 de dezembro e 21 de março) e o pico desses valores no inverno (de 22 de junho a 21 de setembro). Essa variação entre as estações do ano é significativa segundo ANCOVA e Kruskal-Wallis ($p < 0,001$, para ambas as análises). Os testes post-hoc de Tukey e Games-Howell apontaram diferença significativa entre a média do inverno e as médias de todas as outras estações, bem como entre as médias do verão e outono.

Figura 89 – Gráfico de dispersão dos valores da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de *Amphisbaena munoai*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 90 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular de *Amphisbaena munoai* adultos, separados por estações do ano, segundo a data de coleta dos espécimes

As análises histológicas dos testículos de 31 machos, com datas de coleta distribuídas em todos os meses do ano, mostram que os mesmos encontram-se em repouso, apresentando apenas espermatogônias, entre janeiro e maio (Figura 91A) – fase coincidente com a observação de menores volumes testiculares. Os primeiros espermátócitos são observados a partir de junho (Figura 91B), e o epitélio seminífero se desenvolve durante o inverno, atingindo a fase espermiogênica em agosto. Essa fase se estende até novembro (Figura 91C), coincidindo portanto com a fase em que foram observados os maiores volumes testiculares. Já em dezembro, o epitélio seminífero se mostra desestruturado, e os túbulos seminíferos mostram apenas espermatogônias e espermatozóides soltos na luz (Figura 91D). Nos ductos deferentes, foram observados espermatozóides entre outubro e dezembro, portanto até a época de ocorrência de fêmeas com ovos (em novembro e dezembro). Desde o início da fase espermiogênica, em agosto, até o final da fase de estocagem de esperma, em dezembro, o segmento sexual renal permanece hipertrofiado e secretor (Figura 91E). Entre janeiro e julho, por outro lado, os túbulos do SSR não apresentam atividade secretora (Figura 91F).

Figura 91 – Cortes histológicos de machos adultos de *Amphisbaena munoai*

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. testículo de espécime coletado em maio, mostrando apenas espermatogônias nos túbulos seminíferos (MCP 12376); B. testículo de macho coletado em junho, com espermatogônias e espermatócitos (MCP 15040); C. testículo em fase espermiogênica, de macho coletado em setembro (MCP 15412); D. testículo de espécime de dezembro, com espermatogônias no epitélio seminífero e espermatozóides soltos na luz dos túbulos seminíferos (MCP 12075). E. rim de macho coletado em setembro, mostrando túbulos do segmento sexual aumentados e secretores (à esquerda, marcados por asteriscos), e túbulos de área adjacente ao SSR, à direita (MCP 15410); F. rim de macho coletado em fevereiro, sem atividade secretora nos túbulos do segmento sexual renal; o ducto deferente aparece acima, à esquerda (MCP 15960). dd: ducto deferente. Coloração: hematoxilina/eosina.

A partir de setembro começa a ser observado um enovelamento do ducto deferente, um mês antes de serem registrados espermatozóides nesses ductos (Figura 92). Tanto o enovelamento quanto a presença de espermatozóides nos ductos se estendem até dezembro, um mês após o término da fase espermiogênica. Associado a esse enovelamento ocorre um aumento no diâmetro dos ductos no período, como se nota no gráfico de dispersão dessas medidas segundo as datas de coleta dos espécimes (Figura 93). Essa variação é significativa segundo ANOVA e Kruskal-Wallis ($p < 0,001$, em ambas as análises), e os testes post-hoc de Tukey e Games-Howell apontam a média de diâmetro do ducto deferente obtida na primavera como sendo significativamente diferente das médias de todas as demais estações. O diagrama boxplot da figura 94 apresenta os dados de diâmetro do ducto deferente separados por estações do ano, e evidencia não apenas o aumento desses valores na primavera, mas também a ocorrência de alguns valores muito elevados, especialmente durante a estação na qual ocorre estocagem de esperma.

Figura 92 – Ductos deferentes enovelados de *Amphisbaena munoai* macho coletado em outubro (MCP 15634), aumento 1x

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

Figura 93 – Gráfico de dispersão dos valores de diâmetro do ducto deferente de machos adultos de *Amphisbaena munoai*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 94 – Diagrama boxplot dos dados de diâmetro do ducto deferente de *Amphisbaena munoai* adultos, separados por estações do ano, segundo a data de coleta dos espécimes

Foi possível verificar ainda um aumento nas medidas de diâmetro dos rins entre setembro e novembro (Figura 95), época quase coincidente com a fase em que se observou, por meio de análise histológica, a ocorrência de atividade secretora no segmento sexual renal, de agosto a dezembro. Esse aumento durante a primavera fica evidente no boxplot da figura 96, e é estatisticamente significativo segundo ANCOVA ($p < 0,001$). Os valores de comprimento dos rins também apresentam, como se observa na figura 97, um leve aumento entre agosto e novembro. Essa variação, no entanto, não é significativa segundo ANCOVA ($p = 0,752$).

Figura 95 – Gráfico de dispersão dos valores da regressão linear entre diâmetro do rim e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de *Amphisbaena munoai*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 96 – Diagrama boxplot dos dados de diâmetro do rim de *Amphisbaena munoai* adultos, separados por estações do ano, segundo a data de coleta dos espécimes

Figura 97 – Gráfico de dispersão dos valores da regressão linear entre comprimento do rim e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de *Amphisbaena munoai*, segundo as datas de coleta dos espécimes

As características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *A. munoai*, que puderam ser inferidas a partir dos dados apresentados, encontram-se resumidas no quadro 8.

Quadro 8 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *Amphisbaena munoai*, inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos

Sazonalidade do ciclo reprodutivo	Machos	Sazonal, anual
	Fêmeas	Sazonal, possivelmente bienal
Repouso testicular		Janeiro a maio (verão e outono)
Desenvolvimento do epitélio seminífero		Junho e julho (final do outono e início do inverno)
Espermio gênese		Agosto a novembro (inverno e primavera)
Espermatozoides nos ductos deferentes		Outubro a dezembro (primavera)
Segmento sexual renal		Agosto a dezembro (inverno e primavera)
Crescimento folicular		Outubro e novembro (primavera)
Ovos		Novembro e dezembro (primavera)

4.1.9 *Amphisbaena roberti*

Houve dificuldade para o estudo do ciclo reprodutivo de *Amphisbaena roberti*, por conta da pequena quantidade de adultos entre os espécimes amostrados. Entre os 51 espécimes examinados, 20 (4 fêmeas e 16 machos) foram identificados como imaturos por meio de dissecação e exame das gônadas, conforme a metodologia proposta. Entre os 17 machos adultos amostrados, 4 não puderam ser utilizados para as análises de ciclo por não ter sido possível determinar de maneira confiável as datas de coleta dos mesmos. Assim, apenas 14 fêmeas e 13 machos adultos amostrados tinham dados confiáveis de data de coleta. O menor macho adulto da amostra apresentava 131 mm de CRC, e a menor fêmea adulta, 151 mm.

Entre os 13 machos adultos, 11 foram coletados no estado de São Paulo, nos meses de fevereiro, abril, maio, setembro, outubro, novembro e dezembro. Outros dois espécimes foram amostrados em uma região bem distinta, no estado do Tocantins, no mês de julho. Dada a distância entre essas duas amostras, os dados de São Paulo foram analisados separadamente. Os dados de Tocantins não puderam ser utilizados para análise de ciclo reprodutivo, por se limitarem a dois espécimes, coletados em um mesmo mês.

Quanto às fêmeas, foram amostrados 4 espécimes do estado do Tocantins, 1 do sul de Goiás e 9 do estado de São Paulo. As fêmeas do estado do Tocantins foram todas amostradas nos meses de junho e julho, o que somado ao baixo número amostral impede análises de ciclo reprodutivo para aquela região também para as fêmeas.

Os mapas da figura 98 mostram a distribuição das localidades de origem dos espécimes adultos amostrados, nas ecorregiões e biomas brasileiros. Pode-se observar que as localidades do estado de São Paulo e Sul de Goiás estão em regiões de Cerrado ou de transição entre esse bioma e a Mata Atlântica (ecorregiões de Floresta Atlântica do Alto Paraná e Florestas Costeiras da Serra do Mar). Dada essa distribuição, para as análises de ciclo reprodutivo, os dados foram separados em estações seca e chuvosa, de acordo com as datas de coleta dos espécimes.

Figura 98 – Localidades de coleta dos espécimes de *Amphisbaena munoai* adultos amostrados, e sua distribuição nos biomas e ecorregiões brasileiros (à esquerda e à direita, respectivamente)

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

As dez fêmeas adultas amostradas no estado de São Paulo e no sul de Goiás foram coletadas nos meses de janeiro, fevereiro, abril, outubro, novembro e dezembro. Todas apresentavam apenas folículos em vitelogênese primária ou início da vitelogênese secundária, com no máximo 3 mm de comprimento, como se observa no gráfico de dispersão da figura 99. A partir desses dados, é impossível inferir características do ciclo reprodutivo das fêmeas dessa espécie, ao menos para populações de regiões de transição entre Cerrado e Mata Atlântica. A única fêmea com ovos amostrada foi coletada em Palmas (TO), em 17 de julho de 1999 (durante a estação seca), e apresentava 2 ovos nos ovidutos.

Figura 99 – Gráfico de dispersão dos dados de comprimento do maior folículo observado em cada fêmea adulta de *Amphisbaena roberti* amostrada nos estados de São Paulo e Goiás

Os machos, por sua vez, foram amostrados no estado de São Paulo nos meses de fevereiro, abril, maio, setembro, outubro, novembro e dezembro. Uma vez que nenhuma das variáveis analisadas apresentou relação significativa com o CRC, segundo análise de regressão linear, a comparação entre as médias dessas variáveis por estação do ano foi feita por meio de ANOVA. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal e igualdade de variâncias, segundo as análises de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Com a falta de dados de espécimes coletados entre junho e agosto, apenas dois indivíduos foram amostrados na estação seca, e nove na estação chuvosa, uma diferença amostral que prejudica as análises

de variação de volumes testiculares, diâmetro do ducto deferente, e comprimento e diâmetro dos rins por meio de ANOVA. Por isso, também foram observados os resultados dos testes de Kruskal-Wallis quanto à diferença de médias dessas variáveis entre as estações.

Para todas as variáveis analisadas, não se observaram variações significativas entre as estações seca e chuvosa, tanto segundo ANOVA quanto segundo Kruskal-Wallis. De fato, nos gráficos de dispersão dos valores de volume testicular, diâmetro do ducto deferente, comprimento do rim e diâmetro do rim não se observam variações evidentes ao longo do ano, à exceção de um valor destacadamente mais alto de volume testicular em novembro (Figuras 100 a 103). A tabela 10 resume os valores p , R^2 e F resultantes das análises de regressão linear, ANOVA e Kruskal-Wallis das variáveis mencionadas.

Figura 100 – Gráfico de dispersão dos valores de volume testicular de machos adultos de *Amphisbaena roberti* do estado de São Paulo, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 101 – Gráfico de dispersão das medidas de diâmetro do ducto deferente de machos adultos de *Amphisbaena roberti* do estado de São Paulo, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 102 – Gráfico de dispersão das medidas de comprimento do rim de machos adultos de *Amphisbaena roberti* do estado de São Paulo, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 103 – Gráfico de dispersão dos valores de diâmetro do rim de machos adultos de *Amphisbaena roberti* do estado de São Paulo, segundo as datas de coleta dos espécimes

Tabela 10 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de *Amphisbaena roberti*

Variável	N	Regressão linear		N (seca/chuvosa)	ANOVA/ ANCOVA		K-W
		p	R ²		p	F	
Volume testicular	11	0,127	0,239	2 / 9	0,963	0,002	0,814
Diâmetro do ducto deferente	11	0,135	0,231	2 / 9	0,881	0,372	0,238
Comprimento do rim	11	0,714	0,016	2 / 9	0,972	0,350	0,346
Diâmetro do rim	11	0,996	<0,001	2 / 9	0,294	0,601	0,346

K-W: teste de Kruskal-Wallis.

Os índices p considerados significativos ($p < 0,05$) estão em negrito.

Se por um lado as medidas macroscópicas de gônadas e ductos genitais de machos de *Amphisbaena roberti* não permitiram inferir características do ciclo reprodutivo da espécie, os dados obtidos por meio de análise histológica trazem informações sobre esse ciclo. Foram obtidas amostras de testículos, rins e ductos deferentes de nove machos coletados no estado de São Paulo, nos meses de maio, setembro, outubro e novembro. Todos os espécimes amostrados apresentavam-se espermiogênicos, e tinham espermatozóides nos ductos deferentes, sugerindo portanto assazonalidade reprodutiva para a espécie (Figuras 104 A e B).

Por outro lado, as análises histológicas de testículo e rim do espécime ZUEC 1598, coletado em novembro, sugerem que embora a população seja provavelmente assazonal quanto ao ciclo dos machos, os indivíduos podem apresentar um ciclo de atividade e repouso reprodutivo. O espécime em questão se encontrava espermiogênico, com o epitélio seminífero completamente desenvolvido, e uma pequena quantidade de espermatozoides nos ductos deferentes. Porém, diferente dos demais indivíduos amostrados, os túbulos de seu segmento sexual renal não apresentavam atividade secretora (Figuras 104C). É possível, assim, que esse indivíduo estivesse iniciando sua fase espermiogênica. No mesmo mês de coleta desse espécime, foram observados outros 2 machos, em fase espermiogênica, apresentando estocagem no ducto deferente, e com o SSR secretor (Figura 104D). Os dois espécimes de Tocantins, assim como aqueles amostrados em São Paulo, estavam espermiogênicos, com o SSR secretor e apresentavam espermatozóides nos ductos deferentes.

Figura 104 – Cortes histológicos de machos adultos de *Amphisbaena roberti*

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. testículo em fase espermiogênica, de macho coletado em novembro (ZUEC 2069); B. ducto deferente com a luz ocupada por espermatozóides e secreção, de macho coletado em outubro (ZUEC 1548); C. rim de macho coletado em novembro, sem atividade secretora no segmento sexual renal (ZUEC 1598); D. rim de macho coletado em outubro, mostrando os túbulos do segmento sexual renal secretores (ZUEC 1548). Coloração: hematoxilina/eosina.

O quadro 9 resume as características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *A. roberti*, que puderam ser inferidos a partir dos dados de microscopia de luz acima apresentados.

Quadro 9 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *Amphisbaena roberti*, inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos

Sazonalidade do ciclo reprodutivo	Machos	Assazonal, com provável repouso reprodutivo não sincrônico entre os indivíduos da população
	Fêmeas	Dados insuficientes
Espermio gênese		Ao longo de todo o ano
Espermatozoides nos ductos deferentes		Ao longo de todo o ano
Segmento sexual renal		Ao longo de todo o ano
Crescimento folicular		Dados insuficientes
Ovos		Julho (estação seca, espécime de Tocantins)

4.1.10 *Amphisbaena trachura*

Dos 74 espécimes de *Amphisbaena trachura* examinados, observou-se que 27 eram imaturos (6 machos, 6 fêmeas e 15 cujo sexo não pôde ser identificado), e por isso não poderiam ser utilizados para análise do ciclo reprodutivo. Assim, 27 fêmeas e 35 machos adultos foram analisados para estudo do ciclo reprodutivo da espécie. O menor macho adulto amostrado apresentava 184 mm de CRC, e a menor fêmea adulta, 206 mm. Como mostrado nos mapas da figura 105, a amostra inclui espécimes coletados em 25 localidades, nos biomas dos Pampas (ecorregião dos Campos Sulinos) e da Mata Atlântica (ecorregiões de Matas de Araucárias, Floresta Atlântica do Alto Paraná e Florestas Costeiras da Serra do Mar). Todas as localidades estão em áreas de clima temperado, mesotérmico brando (NIMER, 1979). Dado que as quatro estações do ano são bem marcadas nessas regiões, para as análises de variação das medidas de gônadas e ductos genitais, os dados foram separados, segundo as datas e coleta dos espécimes, em verão, outono, inverno e primavera.

Figura 105 – Localidades de coleta dos espécimes de *Amphisbaena trachura* adultos amostrados, e sua distribuição nos biomas e ecorregiões brasileiros (à esquerda e à direita, respectivamente)

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

Entre as 27 fêmeas adultas de *A. trachura* amostradas, apenas uma, coletada no mês de novembro em Cachoeira do Sul (RS), apresentava ovos nos ovidutos. A maior parte das fêmeas analisadas encontrava-se em vitelogênese primária ou no início da vitelogênese secundária, com folículos de comprimentos inferiores a 5 mm. Cinco fêmeas se encontravam em estágios mais avançados de deposição de vitelo, sendo três com folículos entre 7 e 9 mm, e duas com folículos de 13 a 16,2 mm. No gráfico de dispersão dos valores de comprimento do maior folículo medido por fêmea (Figura 106), segundo as datas de coleta dos espécimes, nota-se que essas fêmeas com folículos secundários mais desenvolvidos foram amostradas em maio, outubro e dezembro. Se por um lado a amostra obtida não permite caracterizar satisfatoriamente a curva de crescimento folicular da espécie ao longo do ano, por outro lado a observação de fêmeas em estágios avançados de vitelogênese secundária em meses bem distintos, no outono e na primavera, pode indicar um ritmo de crescimento folicular muito lento nessa espécie, ou duas fases de ovulação ao longo do ano. Com exceção da fêmea amostrada em novembro, com folículos de até 16,2 mm, que é proveniente de localidade inserida na ecorregião de Matas de Araucárias (no estado do Paraná), todas as fêmeas com folículos de comprimentos acima de 5 mm foram amostradas em localidades na ecorregião de Campos Sulinos, no estado do Rio Grande do Sul.

Figura 106 – Gráfico de dispersão das medidas de comprimento do maior folículo ou ovo de cada fêmea adulta de *Amphisbaena trachura* amostrada, segundo as datas de coleta dos espécimes

Foram coletadas, para análise histológica, amostras de ovidutos das 27 fêmeas adultas analisadas. Por meio de microscopia de luz, observou-se a mesma estrutura geral dos ovidutos verificada nas fêmeas das demais espécies analisadas, com endométrio composto de epitélio simples e cúbico, sobre lâmina própria conjuntiva, que pode apresentar glândulas de origem epitelial na porção média do oviduto. Esse conjunto é seguido externamente pelo miométrio e pela serosa. As fêmeas de *A. trachura* com folículos primários não apresentaram glândulas endometriais evidentes no oviduto médio. Em fêmeas com folículos secundários acima de 3,5 mm, passam a ser observadas pequenas glândulas, ainda sem evidência de atividade secretora (Figura 107A). Em duas fêmeas amostradas com folículos secundários de 8,64 e 13,51 mm, as glândulas do endométrio já ocupavam boa parte da espessura da lâmina basal, e apresentavam secreção na parte apical de suas células (Figura 107B). Já em uma fêmea amostrada com folículos de até 16,2 cm, as glândulas se apresentaram repletas de secreção, o que sugere que haja um curto período, de rápido crescimento folicular, entre esse estágio do desenvolvimento do folículo e a ovulação. Ainda nas fêmeas em estágios avançados do depósito secundário de vitelo, com folículos maiores que 13 mm, também se observaram dobras profundas no endométrio do oviduto posterior, e epitélio secretor na região do infundíbulo (Figuras 107 C e D). Essas duas regiões do oviduto passam também, nesses espécimes, a apresentar epitélio colunar, diferindo do epitélio cúbico observado em fêmeas em estágios anteriores do desenvolvimento folicular (Figuras 107E e F). Na porção posterior do infundíbulo, também ocorrem nessa fase pequenas estruturas semelhantes a glândulas, também observadas em *A. infraorbitale* e *A. microcephala*, e que podem corresponder a túbulos de estocagem de esperma (Figura 107D).

Figura 107 – Cortes histológicos de ovidutos de *Amphisbaena trachura* adultas

Fonte: SANTOS, L. C.

A. oviduto médio de fêmea em vitelogênese secundária (com folículos de até 8,5 mm) coletada em maio, apresentando pequenas glândulas no endométrio (setas) (MCP 15676); B. oviduto médio de fêmea em estágio avançado de deposição de vitelo, com folículos de até 13,5 mm, mostrando lâmina basal do endométrio ocupada por glândulas (MCP 6945); C. oviduto posterior de fêmea em vitelogênese secundária (com folículos de até 8,64 mm), mostrando dobras no endométrio (MCP 4804); D. infundíbulo posterior da mesma fêmea da figura B, com glândulas na lâmina basal do endométrio (seta); E. oviduto posterior de fêmea no início da vitelogênese secundária (com folículos de até 4,5 mm) (MCP 18041); F. infundíbulo posterior da mesma fêmea mostrada na figura E. ept: epitélio; lp: lâmina própria. Coloração: hematoxilina/eosina.

Quanto aos machos, as medidas de volume testicular, comprimento e diâmetro dos rins mostraram-se significativamente relacionadas ao CRC, segundo análise de regressão linear, motivo pelo qual as médias dessas variáveis foram comparadas entre as estações do ano por meio de ANCOVA, tendo como covariável o comprimento rostro-cloacal. A mesma relação não se observou com respeito às medidas de diâmetro do ducto deferente, que foram por isso analisadas utilizando-se ANOVA. Os dados de volume testicular e diâmetro do ducto deferente não apresentaram distribuição normal, segundo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,014$, $p = 0,011$, respectivamente), e por isso foram submetidos a transformação logarítmica na base e , resultando em uma distribuição significativamente normal ($p = 0,302$, $p = 0,871$, respectivamente). As medidas de comprimento e diâmetro do rim, por sua vez, são normais segundo Shapiro-Wilk ($p = 0,535$ e $p = 0,995$). Todas as variáveis analisadas têm variâncias homogêneas, segundo teste de Levene. Um problema que se encontrou para as análises de comparação de médias entre as estações do ano foi a amostragem de apenas um espécime entre o final de dezembro e o final de março, durante o verão. Para não comprometer as análises, as mesmas foram realizadas apenas com os dados de outono, inverno e primavera, embora o dado do verão tenha sido mantido nos gráficos de dispersão e diagramas boxplot apresentados a seguir.

Os gráficos de dispersão e boxplots das medidas de volume testicular mostraram a ocorrência de três valores destacadamente altos em agosto, setembro e outubro, correspondentes aos espécimes MHNCI 9279, MHNCI 6986 e MHNCI 7789 (Figuras 108 e 109). O primeiro desses espécimes foi coletado no estado de Santa Catarina, e os outros dois, no estado do Paraná, todos na ecorregião de Matas de Araucárias. Como se observa no mapa da figura 105, as localidades de proveniência das *A. trachura* amostradas se concentram em dois grupos, sendo um distribuído no estado do Rio Grande do Sul, nas ecorregiões de Campos Sulinos, Floresta Atlântica do Alto Paraná, Florestas Costeiras da Serra do Mar e Matas de Araucária, e um outro mais afastado, nos estados de Santa Catarina e Paraná, na ecorregião de Matas de Araucária. Tendo em vista essa distribuição das localidades e o registro de volumes testiculares muito altos em espécimes de Santa Catarina e Paraná, e havendo a possibilidade de que houvessem diferenças no ciclo reprodutivo ou nas medidas dos testículos de espécimes de uma e outra região, as análises estatísticas foram executadas duas vezes, uma incluindo todos os dados, e outra apenas com os dados do Rio Grande do Sul. Não foi possível realizar análises apenas com os dados de Paraná e Santa Catarina devido ao número amostral obtido nesses estados (dois machos adultos de Santa Catarina e 5 do Paraná). Foi ainda realizado teste t para comparar as médias de volumes testiculares dos

espécimes do Rio Grande do Sul e dos outros dois estados, mas não se observou diferença significativa ($p = 0,160$, para variâncias iguais não assumidas). Ao se separar o grupo amostral do rio Grande do Sul, os testes de normalidade e homocedasticidade foram repetidos para essa amostra. Assim como observado no conjunto completo de dados, os valores de diâmetro do ducto deferente e volume testicular não têm distribuição normal, mas nessa amostra, os dados de volume não se adequaram à normalidade mesmo após transformação logarítmica. Por isso, para comparação entre as médias das estações do ano nesse caso, foi também observado o resultado do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Ao se analisar somente os dados do Rio Grande do Sul, o gráfico de dispersão de volumes testiculares (Figura 110) mostra valores maiores entre agosto e outubro, e uma medida elevada em março. Segundo ANCOVA, porém, não há variação significativa nessa variável ao longo do ano nessa amostra, tampouco na amostra que inclui os dados de Santa Catarina e Paraná ($p = 0,170$ e $p = 0,072$, respectivamente). O teste de Kruskal-Wallis também não aponta diferença significativa entre as médias da variável considerando-se os espécimes do Rio Grande do Sul, cujos dados não têm distribuição normal ($p = 0,136$). Os valores p e F obtidos das análises de comparação de médias, bem como os valores de p e R^2 resultantes das análises de regressão linear acima referidas, encontram-se resumidos na tabela 11.

Figura 108 – Gráfico de dispersão dos valores da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de *Amphisbaena trachura*, segundo as datas de coleta dos espécimes (amostra completa)

Figura 109 – Diagrama boxplot dos dados de volume testicular de *Amphisbaena trachura* adultos, separados por estações do ano, segundo a data de coleta dos espécimes (amostra completa)

Figura 110 – Gráfico de dispersão dos valores da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de *Amphisbaena trachura* coletados no estado do Rio Grande do Sul, segundo as datas de coleta dos espécimes

Tabela 11 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de *Amphisbaena trachura*

Grupo amostral	Variável	N	Regressão linear		N (outono/ inverno/ primavera)	ANCOVA		K-W
			p	R ²		p	F	
Amostra completa	Volume testicular	34	0,003	0,249	12/13/9	0,072*	2,880*	0,071
	Diâmetro do ducto deferente	32	0,195	0,055	11/13/8	0,029*	4,005*	0,045
	Comprimento do rim	27	<0,001	0,600	10/12/5	0,853	0,160	0,737
	Diâmetro do rim	27	0,037	0,163	10/12/5	0,510	0,693	0,873
Rio Grande do Sul	Volume testicular		0,047	0,143	10/12/5	0,170	1,914	0,136**
	Diâmetro do ducto deferente		0,409	0,026	10/12/5	0,110*	2,420*	0,176
	Comprimento do rim		<0,001	0,591	10/12/5	0,853	0,160	0,737
	Diâmetro do rim		0,031	0,167	10/12/5	0,510	0,693	0,873

K-W: teste de Kruskal-Wallis.

Os índices p considerados significativos ($p < 0,05$) estão em negrito.

*A variável não tem distribuição normal, e por isso foram usados para análise os dados submetidos a transformação logarítmica (ln).

** A amostra não apresenta distribuição normal mesmo após transformação logarítmica, e por isso o teste de Kruskal-Wallis é mais confiável para a análise de comparação das médias.

Diferente do que se observou para os dados de volume testicular, as medidas de diâmetro do ducto deferente de espécimes de Santa Catarina e Paraná não apresentaram valores destacados dos demais, como se observa no gráfico de dispersão dessas medidas para a amostra completa, e no diagrama boxplot que as organiza por estações do ano (Figuras 111 e 112). Nesse gráfico de dispersão, o único valor visivelmente maior do que os demais corresponde ao espécime MCP 18278, coletado no mês de outubro no Rio Grande do Sul, e

que apresentava os ductos deferentes muito enovelados em toda a sua extensão. A análise de ANOVA não aponta variação significativa dessas medidas entre as estações do ano quando considerados apenas os dados dos espécimes do Rio Grande do Sul, cuja distribuição ao longo do ano está ilustrada no gráfico da figura 113 ($p = 0,110$). No entanto, quando considerada a amostra completa essa análise resulta em um valor p de 0,029. O teste post-hoc de Tukey indica que, nessa amostra, a média de diâmetro do ducto deferente da primavera (estação na qual foi amostrado o espécime MCP 18278, acima referido) difere significativamente daquelas obtidas no outono e no inverno. Por sua vez, o teste de Games-Howell, que tem acurácia mesmo com diferentes números amostrais por nível do fator, não encontrou diferença significativa entre as estações.

Figura 111 – Gráfico de dispersão das medidas de diâmetro do ducto deferente de machos adultos de *Amphisbaena trachura*, segundo as datas de coleta dos espécimes e considerando a amostra completa

Figura 112 – Diagrama boxplot dos dados de diâmetro do ducto deferente de *Amphisbaena trachura* adultos, separados por estações do ano, segundo a data de coleta dos espécimes e considerando a amostra completa

Figura 113 – Gráfico de dispersão das medidas de diâmetro do ducto deferente de machos adultos de *Amphisbaena trachura* coletados no estado do Rio Grande do Sul, segundo as datas de coleta dos espécimes

As medidas de comprimento e diâmetro dos rins puderam ser obtidas apenas dos espécimes do Rio Grande do Sul. Não foram observadas variações ao longo do ano para nenhuma dessas duas variáveis, segundo ANCOVA ($p = 0,853$ para comprimento do rim e $p = 0,510$ para diâmetro do rim), como ilustrado pelos gráficos de dispersão das figuras 114 e 115.

Figura 114 – Gráfico de dispersão das medidas de comprimento do rim de machos adultos de *Amphisbaena trachura* coletados no estado do Rio Grande do Sul, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 115 – Gráfico de dispersão das medidas de diâmetro do rim de machos adultos de *Amphisbaena trachura* coletados no estado do Rio Grande do Sul, segundo as datas de coleta dos espécimes

Foram coletadas, para análise histológica, amostras de testículos, ductos deferentes e rins de 24 machos adultos, coletados em dez diferentes meses do ano (não se obtiveram amostras dos meses de janeiro e novembro), dos quais 22 provieram de localidades no Rio Grande do Sul. Outros dois espécimes foram coletados no estado do Paraná, em agosto, e de Santa Catarina, em outubro. Esses dois espécimes apresentaram-se em fases da espermatogênese coincidentes com outros espécimes do Rio Grande do Sul coletados no mesmo mês, portanto não se pode dizer, a partir desses dados, que haja diferença entre os ciclos reprodutivos das populações dessas duas regiões.

As análises histológicas de machos de *A. trachura* trouxeram alguns dados conflitantes, e como consequência o ciclo da espécie ainda não pôde ser caracterizado com clareza. Para facilitar a exposição do que foi observado nessas análises, os resultados serão comentados em duas etapas: primeiro, serão descritas as amostras coletadas entre os meses de julho e dezembro, e em seguida, as amostras coletadas de fevereiro a junho.

Nessa espécie, entre os meses de julho e dezembro, foram amostrados 14 espécimes, dos quais 1 tinha apenas espermatogônias nos túbulos seminíferos, 8 tinham o epitélio seminífero desenvolvido até o estágio de espermatócitos, e 5 estavam em fase espermiogênica. No entanto, os meses com registros de machos espermiogênicos se alternam com meses em que foram observados apenas machos com espermatócitos. Em julho, foi observado o único macho desse intervalo do ano que apresentava apenas espermatogônias nos túbulos seminíferos, ductos deferentes vazios e ausência de atividade secretora no segmento sexual renal. Também no mês de julho, foi registrado um macho em fase espermiogênica, apresentando espermatozóides nos ductos deferentes e com o SSR secretor. Nos meses seguintes, em agosto e setembro, os oito espécimes amostrados se apresentavam em estágios da espermatogênese anteriores àquele no qual se encontrava o espécime espermiogênico de julho: seis deles tinham o epitélio seminífero desenvolvido até o estágio de espermatócitos, ao passo que outros dois encontravam-se no início da fase espermiogênica, sem no entanto terem sido observados espermatozóides já formados na luz dos túbulos seminíferos. Nenhum desses oito espécimes mostrava espermatozóides nos ductos deferentes, e apenas um, no início da fase espermiogênica, apresentava atividade secretora no SSR. Em outubro, os três espécimes amostrados encontravam-se espermiogênicos, com uma grande quantidade de espermatozóides sendo formada junto à luz dos túbulos seminíferos (Figura 116 A). Esses espécimes apresentavam ainda espermatozóides nos ductos deferentes e SSR secretor (Figuras 116 B e C). Em dezembro, o único espécime amostrado apresentava espermatócitos nos túbulos seminíferos, em um estágio espermatogênico anterior àquele observado em

outubro. Assim, foram amostrados espécimes em plena fase espermiogênica em julho e outubro, registros esses intercalados com espécimes cujo epitélio seminífero apresentava até espermatócitos, ou até espermatozóides no início de sua diferenciação. Dessa forma, os machos da espécie parecem iniciar sua fase espermiogênica entre julho e dezembro, mas não foi observada sincronia entre os indivíduos, sendo difícil caracterizar as fases do desenvolvimento da linha seminal na espécie.

Entre fevereiro e junho, por outro lado, a maioria dos espécimes se encontrava em fase de repouso testicular: seis entre os dez indivíduos amostrados nesse período tinham apenas espermatogônias nos túbulos seminíferos (Figura 116D). Outros dois espécimes, coletados em maio, tinham além das espermatogônias junto à lâmina basal, alguns espermatozóides soltos na luz dos túbulos seminíferos, possivelmente remanescentes de sua fase reprodutiva anterior (Figura 116E). Um espécime de abril, por sua vez, tinha seu epitélio seminífero desenvolvido até o estágio de espermatócitos. Nenhum desses espécimes apresentava atividade secretora no segmento sexual renal ou espermatozóides nos ductos deferentes (Figura 116F). Um espécime de fevereiro, embora tivesse nos túbulos seminíferos apenas espermatogônias e espermatozóides soltos, destoou dos demais amostrados nesse período por apresentar ainda espermatozóides nos ductos deferentes e o segmento sexual renal secretor. É possível, portanto, que a espermiogênese ocorra nessa espécie entre os meses de julho e fevereiro, sem evidências de sincronia entre os indivíduos, e que uma fase de repouso testicular tenha lugar entre abril e junho.

Figura 116 – Cortes histológicos de machos adultos de *Amphisbaena trachura*

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. testículo de macho em fase espermiogênica, de macho coletado em outubro (MHNI 7789); B. ducto deferente com espermatozoides em sua luz, do mesmo espécime da figura A; C. segmento sexual renal em fase secretora, de macho coletado em outubro (MCP 6304); D. testículo de espécime coletado em maio, apresentando apenas espermatogônias (MCP 5591); E. testículo de macho coletado em maio, apresentando espermatogônias junto à lâmina basal dos túbulos seminíferos e espermatozoides soltos na luz desses túbulos (MCP 6950); F. segmento sexual renal em fase não secretora, do mesmo espécime da figura E. Coloração: hematoxilina/eosina.

O quadro 10 resume as características do ciclo reprodutivo de *A. trachura* que puderam ser estimadas com base nos dados apresentados, apesar de não ter sido possível compreender com clareza o padrão do ciclo espermiogênico da espécie.

Quadro 10 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *Amphisbaena trachura*, inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos

Sazonalidade do ciclo reprodutivo	Machos	Sazonal, com diferenças de fase entre os indivíduos
	Fêmeas	Dados insuficientes
Repouso testicular		Abril a junho (outono)
Desenvolvimento do epitélio seminífero		Entre julho e fevereiro (inverno, primavera e verão)
Espermiogênese		Entre julho e outubro (inverno e primavera)
Espermatozóides nos ductos deferentes		Entre julho e fevereiro (inverno, primavera e verão)
Segmento sexual renal		Entre julho e outubro (apenas nos espécimes espermiogênicos)
Crescimento folicular		Dados insuficientes
Ovos		Novembro (primavera)

4.4.11. *Amphisbaena vermicularis*

Por meio do exame das gônadas e ductos genitais durante dissecação, verificou-se que da amostra de 37 espécimes de *Amphisbaena vermicularis* analisados, 7 espécimes eram imaturos (4 fêmeas e três machos). Houve ainda dúvida quanto a data de coleta de um macho adulto. Assim, 14 fêmeas e 15 machos puderam ser utilizados para as análises de ciclo reprodutivo. Entre os machos adultos, o menor comprimento rostro-cloacal observado foi de 176 mm, ao passo que a menor fêmea adulta amostrada apresentava 220 mm de CRC.

Como se observa nos mapas da figura 117, os espécimes amostrados provieram de 11 diferentes localidades, inseridas nos biomas do Cerrado e Amazônia. As duas localidades no bioma amazônico estão incluídas na ecorregião de Matas Secas de Chiquitano, que apresenta,

assim como o Cerrado, uma estação seca bem marcada no meio do ano. Por isso, os dados dos espécimes coletados nessas duas localidades foram analisados juntamente com os dados daqueles provindos de localidades do Cerrado. Assim, as análises de variação das medidas de volume testicular, diâmetro do ducto deferente, e comprimento e diâmetro do rim foram realizadas separando-se os dados entre as estações seca e chuvosa, de acordo com a data de coleta dos espécimes.

No gráfico de dispersão das medidas de comprimento do maior folículo observado em cada fêmea adulta de *A. vermicularis* (Figura 118), nota-se que foi amostrada apenas uma fêmea com folículos secundários de comprimento superior a 5 mm. Esse espécime foi coletado no mês de novembro, e apresentava folículos de até 9,17 mm, o que sugere que a fase de maior crescimento folicular precedendo a ovulação ocorra durante a estação chuvosa. No entanto, a partir dos dados obtidos, não é possível caracterizar o ciclo reprodutivo das fêmeas da espécie quanto às fases de crescimento folicular e ovulação.

Figura 117 – Localidades de coleta dos espécimes de *Amphisbaena vermicularis* adultos amostrados, e sua distribuição nos biomas e ecorregiões brasileiros (à esquerda e à direita, respectivamente)

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

Figura 118 – Gráfico de dispersão das medidas de comprimento do maior folículo ou ovo de cada fêmea adulta de *Amphisbaena vermicularis* amostrada em região de Cerrado ou Matas Secas de Chiquitano, segundo as datas de coleta dos espécimes

Foram processadas para análise histológica amostras de ovidutos de seis fêmeas, coletadas nos meses de março, maio, julho e novembro. Dessas, quatro encontravam-se em vitelogênese primária, e apresentavam pequenas glândulas no endométrio. Uma fêmea amostrada no início da vitelogênese secundária, com folículos de até 4,5 mm, mostrava glândulas mais conspícuas em relação às fêmeas em vitelogênese primária, porém ainda sem atividade secretora (Figura 119A). Foi ainda analisado histologicamente o oviduto da fêmea UFMT 6301, que apresentava os maiores folículos medidos nessa amostra (de até 9,17 mm). Esse espécime tinha no oviduto médio glândulas já com grânulos de secreção, e chegava a apresentar pequenas glândulas, não secretoras, também na transição dessa região para o oviduto posterior (Figura 119B). A porção posterior do oviduto, por sua vez, apresenta nesse espécime dobras profundas no endométrio, e epitélio colunar ciliado. Esse aspecto dos ovidutos da fêmea UFMT 6301 sugere que a mesma havia entrado na fase final e mais intensa de deposição de vitelo.

Figura 119 – Cortes histológicos de ovidutos de *Amphisbaena vermicularis* adultas

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. oviduto médio de espécime coletado em maio, mostrando glândulas sem atividade secretora no endométrio (setas) (CHUNB 53043); B. oviduto posterior de fêmea em vitelogênese secundária, coletada em novembro, mostrando dobras no endométrio e glândulas na lâmina própria do mesmo (setas) (UFMT 6301). ept: epitélio; lp: lâmina própria Coloração: hematoxilina/eosina.

Quanto aos machos, as medidas de volume testicular, diâmetro e comprimento dos rins apresentaram relação significativa com o CRC, segundo análise de regressão linear, e por isso a diferença de média dessas variáveis entre as estações foi testada por meio de ANCOVA. Por outro lado, os diâmetros dos ductos deferentes não têm relação significativa com o comprimento rostro-cloacal, motivo pelo qual sua variação foi analisada utilizando-se ANOVA. As medidas de volume testicular não apresentaram distribuição normal, segundo o teste de Shapiro-Wilk, e por isso foram submetidos a transformação logarítmica. Essa transformação resultou em uma distribuição normal ($p = 0,265$), que pôde então ser submetida a ANCOVA. As demais variáveis apresentaram distribuições normais, e todas têm variâncias homogêneas, segundo teste de Levene. Os valores p e R^2 obtidos das análises de regressão linear acima referidas, e os valores p e F das análises de comparação de médias entre estações, que serão apresentadas a seguir, estão resumidos na tabela 12.

Tabela 12 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de *Amphisbaena vermicularis*

Variável	N	Regressão linear		N (seca/chuvosa)	ANCOVA		K-W
		p	R ²		p	F	P
Volume testicular	15	<0,001	0,878	6 / 9	0,462*	0,576*	0,724
Diâmetro do ducto deferente	15	0,173	0,138	6 / 9	0,127	2,651	0,126
Comprimento do rim	15	<0,001	0,837	6 / 9	0,363	0,893	0,814
Diâmetro do rim	15	0,003	0,510	6 / 9	0,254	1,435	0,637

K-W: teste de Kruskal-Wallis.

Os índices p considerados significativos ($p < 0,05$) estão em negrito.

*A variável não tem distribuição normal, e por isso foram utilizados para análise os dados submetidos a transformação logarítmica (ln).

O gráfico de dispersão dos valores de resíduos resultantes da regressão linear entre as medidas de volume testicular e CRC sugere a ocorrência de maiores testículos entre abril e agosto, na estação seca (Figura 120). O diagrama boxplot que apresenta os dados de volume testicular separados por estação do ano evidencia essa ocorrência, na amostra, de maiores valores durante a estação seca. Essa variação, no entanto, não é significativa segundo ANCOVA ($p = 0,462$).

O outlier MNRJ 20290, evidenciado no diagrama da figura 121, corresponde ao espécime de maior CRC amostrado entre os machos de *A. vermicularis* (334 mm), com data de coleta de dezembro. Uma vez que os volumes testiculares se mostraram significativamente relacionados ao CRC, isso pode ter produzido o destacamento do dado desse espécime. Esse dado, no entanto, não corresponde a um dos pontos de maior valor registrados no gráfico de dispersão da figura 120, no qual o efeito do CRC foi eliminado. O mesmo se aplica ao outlier correspondente ao espécime CHUNB 35349 (297 mm de CRC), coletado em novembro, e cujo dado não aparece destacado no gráfico de dispersão da figura 120.

Figura 120 – Gráfico de dispersão dos valores da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de *Amphisbaena vermicularis*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 121 – Diagrama boxplot dos dados volume testicular de *Amphisbaena vermicularis* adultos, separados por estações do ano, segundo a data de coleta dos espécimes

Se ao se observar o gráfico de dispersão dos dados de volume testicular esses valores parecem aumentar durante a estação seca, o mesmo não se observa em relação ao diâmetro dos ductos deferentes. O gráfico de dispersão desses dados (que não elimina o efeito do CRC, dado que não foi observada relação significativa entre essas variáveis) mostra apenas um valor destacado em novembro, correspondente ao espécime CHUNB 35349, já mencionado acima, e que apresentava os ductos deferentes bem enovelados (Figura 122). Esse enovelamento, por sua vez, foi também observado ao longo de todo o ano. De fato, a análise de ANOVA não apontou variação significativa nos valores de diâmetro do ducto deferente entre as estações seca e chuvosa ($p = 0,127$).

Figura 122 – Gráfico de dispersão das medidas de diâmetro do ducto deferente de machos adultos de *Amphisbaena vermicularis*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Assim como observado em relação aos dados de diâmetro do ducto deferente, não houve variação evidente nas medidas de comprimento do rim ao longo do ano, como se observa pelo gráfico da figura 123. A análise de ANCOVA não aponta diferença significativa entre as médias das estações seca e chuvosa também para essa variável ($p = 0,363$). Os valores de diâmetro do rim, por sua vez, parecem ter um aumento em novembro e dezembro, durante a estação chuvosa, segundo o gráfico de dispersão desses dados removendo-se o efeito do CRC (Figura 124). Essa variação, no entanto, também não é significativa segundo ANCOVA ($p = 0,254$).

Figura 123 – Gráfico de dispersão dos valores da regressão linear entre comprimento do rim e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de *Amphisbaena vermicularis*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 124 – Gráfico de dispersão dos valores da regressão linear entre diâmetro do rim e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de *Amphisbaena vermicularis*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Foram analisados sob microscopia de luz os testículos, ductos deferentes e rins de 8 espécimes de *A. vermicularis*, coletados nos meses de janeiro, março, junho e novembro, sendo 2 espécimes da estação seca e 6 da estação chuvosa. Todos os espécimes amostrados apresentavam-se espermiogênicos, tinham espermatozóides misturados a gotículas de secreção nos ductos deferentes, e mostravam atividade secretora no segmento sexual renal (Figuras 125A e B). No espécime MNRJ 20290, o indivíduo com maior CRC amostrado (334 mm), foi possível mesmo identificar a olho nu os túbulos do segmento sexual renal, mais largos e de cor amarelo-leitosa, provavelmente devido ao acúmulo de secreção (Figura 126). Esses resultados, bem como a ausência de variação significativa ao longo do ano nas medidas de volume testicular, diâmetro do ducto deferente, e comprimento e diâmetro dos rins, indicam assazonalidade reprodutiva para os machos da espécie.

Figura 125 – Cortes histológicos de machos adultos de *Amphisbaena vermicularis* de região de Cerrado

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. testículo espermiogênico de espécime coletado em julho (UFMT 834); B. ducto deferente com espermatozóides e gotículas de secreção, e túbulo do segmento sexual renal em fase secretora (*) (UFMT 8333). dd: ducto deferente. Coloração: hematoxilina/eosina.

Figura 126 – Rim e ducto deferente de *Amphisbaena vermicularis* macho coletado em dezembro, com os túbulos do segmento sexual renal visíveis e mostrando enovelamento do ducto deferente

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

dd: ducto deferente; ig: intestino grosso; r: rim; ssr: segmento sexual renal.

O quadro 11 resume as informações obtidas sobre os ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *A. vermicularis*, a partir dos dados macroscópicos e histológicos apresentados.

Quadro 11 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *Amphisbaena vermicularis*, inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos

Sazonalidade do ciclo reprodutivo	Machos	Assazonal
	Fêmeas	Dados insuficientes
Repouso testicular	Não observado	
Espermiogênese	Ao longo do ano	
Espermatozóides nos ductos deferentes	Ao longo do ano	
Segmento sexual renal	Ao longo do ano	
Crescimento folicular	Possivelmente durante estação chuvosa	
Ovos	Não observados	

4.1.12 *Blanus cinereus*

Os espécimes de *Blanus cinereus* amostrados são provindos de 17 diferentes localidades na península Ibérica, todas do bioma de Floresta Mediterrânea de Bosques e Arbustos, e distribuídas nas ecorregiões de Florestas Ibéricas Semideciduais e Esclerófilas, Florestas Esclerófilas e Mistas do Sudoeste Ibérico Mediterrâneo, e de Bosques e Arbustos do Sudeste Ibérico (Figura 127). Quanto à sazonalidade, de maneira geral, essas regiões apresentam inverno ameno e sub-úmido (de dezembro a março), e verão quente e seco (de junho a setembro). O outono e primavera também são razoavelmente bem marcados, e por isso, nas análises que seguem, os dados foram divididos considerando-se quatro estações do ano.

Entre os espécimes amostrados, verificou-se que 10 eram imaturos (2 fêmeas e 8 machos), e 60 eram adultos (32 fêmeas e 28 machos). A menor fêmea adulta amostrada apresentava 142 mm de CRC, e o menor macho adulto, 129 mm. As fêmeas adultas foram coletadas em oito diferentes meses do ano, sendo que não foram obtidas amostras dos meses de janeiro, outubro, novembro e dezembro. Como se nota no gráfico de dispersão de comprimentos do maior folículo medido em cada fêmea (Figura 128), em todos os meses amostrados foram observados espécimes em vitelogênese primária. Poucos espécimes dissecados tinham folículos no início da vitelogênese secundária, e o maior folículo medido nessa amostra, em junho, apresentava 4,28 mm. Não é possível, portanto, a partir desses dados, estimar a época e duração da fase de mais intensa deposição de vitelo precedendo a ovulação, bem como a época de ovulação propriamente dita.

Figura 127 – Localidades de coleta dos espécimes de *Blanus cinereus* adultos amostrados, e sua distribuição nas ecorregiões da Península Ibérica

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

Figura 128 – Gráfico de dispersão dos dados de comprimento do maior folículo observado em cada fêmea adulta de *Blanus cinereus* amostrada, segundo as datas de coleta dos espécimes

Os machos, por sua vez, foram amostrados em seis meses do ano, de fevereiro a junho e em setembro. Os dados de volume testicular, diâmetro do ducto deferente e comprimento e diâmetro dos rins foram submetidos a testes de normalidade e homocedasticidade, precedendo as análises de comparação de médias das variáveis entre as estações do ano. Apenas os dados de diâmetro dos ductos deferentes não apresentaram distribuição normal ($p = 0,007$). No entanto, essa distribuição se adequou à normalidade ao se submeter os dados a transformação logarítmica ($p = 0,877$). Por isso, para a análise de ANOVA dessa variável, foram utilizados os dados transformados. Todas as variáveis analisadas apresentaram igualdade de variâncias, segundo o teste de Levene.

Uma vez que os testículos mostraram-se significativamente relacionados ao comprimento rostro-cloacal dos espécimes, segundo análise de regressão linear ($p = 0,033$), são apresentados no gráfico da figura 129 os valores de resíduos dessa regressão. Esse gráfico sugere um aumento nos volumes testiculares entre maio e junho. Embora a falta de dados em julho, agosto, e na maior parte do segundo semestre não permita acompanhar a evolução desses dados, nota-se que em setembro os volumes medidos já são bem menores do que aqueles observados em junho. Essa variação não é significativa segundo análise de ANCOVA, tendo como co-variável o CRC ($p = 0,171$). No entanto, a análise de comparação de médias entre as estações do ano ficou comprometida, nessa espécie, devido a falha amostral no segundo semestre e em janeiro. Por conta dessa falta de dados, não foram amostrados espécimes no inverno (do final de dezembro ao final de março), e apenas um indivíduo foi coletado no outono (entre o final de setembro e o final de dezembro). Assim, as análises de

comparação de médias avaliam, de fato, diferenças entre as médias obtidas na primavera e no verão, que por sua vez também tem números amostrais discrepantes. A tabela 13 resume os valores p e F obtidos das análises de comparação de médias e os valores p e R^2 resultantes das análises de regressão linear para as variáveis amostradas dos machos dessa espécie.

Figura 129 – Gráfico de dispersão dos resíduos resultantes da análise de regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal, de machos adultos de *Blanus cinereus*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Tabela 13 – Índices resultantes dos testes estatísticos de regressão linear e de diferença de médias das variáveis obtidas de machos de *Blanus cinereus*

Variável	N	Regressão linear		N (verão/outono/ inverno/primavera)	ANOVA/ ANCOVA		K-W p
		p	R^2		p	F	
Volume testicular	25	0,033	0,183	1 / 1 / 3 / 20	0,171	1,846	0,286
Diâmetro do ducto deferente	22	0,337	0,046	0 / 1 / 2 / 19	0,533*	0,651*	0,386
Comprimento do rim	22	0,001	0,283	0 / 1 / 2 / 19	0,344	1,132	0,176
Diâmetro do rim	22	0,011	0,283	0 / 1 / 2 / 19	0,084	2,845	0,043

K-W: teste de Kruskal-Wallis.

Os índices p considerados significativos ($p < 0,05$) estão em negrito.

*A variável não tem distribuição normal, e por isso foram usados para análise os dados submetidos a transformação logarítmica (ln).

As medidas de diâmetro do ducto deferente também apresentaram maiores valores nos meses de maio e junho, época na qual também é observado o enovelamento desses ductos, como se nota no gráfico da figura 130. Em maio, três dessas medidas de diâmetro ainda são semelhantes às de meses anteriores, embora já se observe o enovelamento dos ductos. Isso pode sugerir que o início da fase de estocagem de espermatozóides nesses ductos se dê em maio. A variação observada no gráfico, no entanto, não é significativa segundo ANOVA ($p = 0,533$), o que pode se dever, assim como no caso dos volumes testiculares, à escassez de dados na amostragem.

Figura 130 – Gráfico de dispersão dos dados de diâmetro do ducto deferente de *Blanus cinereus* adultos, segundo as datas de coleta dos espécimes

As medidas de comprimento e diâmetro dos rins mostraram-se significativamente relacionadas ao CRC, e por isso os gráficos de dispersão das figuras 131 e 132 foram construídos a partir dos valores de resíduos da regressão linear dessas variáveis com o comprimento rostro-cloacal. Como se observa nesses gráficos, também para as medidas de rins, os maiores valores observados são dos espécimes coletados em maio e junho. Porém, também para essas variáveis, essa diferença não é significativa segundo ANCOVA ($p = 0,344$ para comprimento do rim, e $p = 0,084$ para diâmetro do rim). Por outro lado, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis aponta diferença significativa entre as médias de diâmetro do rim obtidas a primavera (de março a junho) e no verão (do final de julho ao final de setembro) ($p = 0,043$).

Figura 131 – Gráfico de dispersão dos resíduos resultantes da análise de regressão linear entre comprimento do rim e comprimento rostro-cloacal, de machos adultos de *Blanus cinereus*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 132 – Gráfico de dispersão dos resíduos resultantes da análise de regressão linear entre diâmetro do rim e comprimento rostro-cloacal, de machos adultos de *Blanus cinereus*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Tendo em vista o exposto, os dados obtidos sugerem que os machos de *Blanus cinereus* iniciam sua fase reprodutiva entre maio e junho, quando são observados os maiores valores de volume testicular, diâmetro do ducto deferente e diâmetro do rim, embora a variação nessas medidas não tenha sido significativa.

4.1.13. *Blanus mettetali*

Foram analisadas lâminas histológicas de 6 fêmeas e 12 machos de *Blanus mettetali* provenientes do Marrocos, região de clima mediterrâneo, com verão quente e seco e inverno brando e semi-úmido. As lâminas de fêmeas e de dois machos não tinham especificadas as datas de coleta dos espécimes.

Nas lâminas de ovidutos de fêmeas, observa-se que, assim como nas espécies amostradas no Brasil, esses órgãos apresentam um endométrio composto por epitélio e lâmina basal de tecido conjuntivo, no qual podem ser observadas glândulas (Figura 133B). Na porção posterior do oviduto, porém, essas glândulas não estão presentes (Figura 133A). Os rins das fêmeas se mantêm sempre sem diferenciação de túbulos na região correspondente ao segmento sexual renal (Figura 133B).

Figura 133 – Cortes histológicos de fêmeas de *Blanus mettetali*

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. oviduto posterior e rim, mostrando ausência de um segmento sexual renal (espécime Bc 4); B. oviduto médio, mostrando pequenas glândulas no endométrio (espécime Bc 5). ovd: oviduto; r: rim. Coloração: hematoxilina/eosina.

Os dez machos cujas lâminas tinham informação de data de coleta são representativos dos meses de janeiro, março, abril, maio, junho, agosto e dezembro. Entre janeiro e março, no inverno, os três machos amostrados apresentavam em seus túbulos seminíferos apenas espermatogônias em multiplicação (Figura 134A). Já na primavera, em abril, começam a ser observados espermatócitos no epitélio seminífero (Figura 134B). Até essa fase, não há atividade secretora na região do segmento sexual renal. A espermatogênese progride rapidamente, de modo que os dois espécimes amostrados em maio já se encontram no início sua fase espermiogênica (Figura 134C). Não havia lâminas conservadas dos rins desses espécimes, e por isso não é possível dizer se o segmento sexual renal já está ativo nessa fase. O espécime amostrado em junho, ainda na primavera e também em fase espermiogênica, apresentava atividade secretora no segmento sexual renal, e presença de espermatozóides nos ductos deferentes (Figuras 134D e E). As células do epitélio do ducto deferente têm núcleo central, e não foram observadas células secretoras nessa região. Assim como o desenvolvimento do epitélio seminífero, a desestruturação do mesmo é rápida, uma vez que só se observam espermatogônias nos túbulos seminíferos do espécime amostrado em agosto, já no verão (Figura 134F). Nessa fase, não há atividade secretora no segmento sexual renal e os ductos deferentes estão vazios. A observação de espermatozóides nos ductos deferentes apenas em junho, concomitante com a espermiogênese, indica que a cópula deve ocorrer naquela mesma época. O único macho amostrado em dezembro mantinha-se em repouso testicular, como observado no espécime de agosto.

Figura 134 – Cortes histológicos de machos de *Blanus mettetalii*

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. testículo de macho coletado em janeiro, com espermatogônias fase de multiplicação (espécime Bc 10); B. testículo de macho de abril, mostrando espermatogônias e espermatócitos (espécime Bc 2); C. testículo no início da fase espermiogênica, de macho coletado em maio (espécime Bc 24); D. testículo em fase espermiogênica, de espécime de junho (espécime Bc 8); E. segmento sexual renal em fase secretora e ducto deferente contendo espermatozoides, do mesmo espécime da figura D; F. testículo de espécime de agosto, mostrando apenas espermatogônias nos túbulos seminíferos. Coloração em A, B e E: hematoxilina/eosina; coloração em C, D e F: tricrômico.

O quadro 12 resume as características do ciclo reprodutivo de machos de *Blanus mettetali*, com base nos dados obtidos a partir das análises de microscopia de luz acima apresentadas.

Quadro 12 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *Blanus mettetali*, inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos

Sazonalidade do ciclo reprodutivo	Sazonal
Repouso testicular	Agosto a março (verão, outono e inverno)
Desenvolvimento do epitélio seminífero	Abril (primavera)
Espermio gênese	Maio e junho (primavera)
Espermatozóides nos ductos deferentes	Maio e junho (primavera)
Segmento sexual renal	Maio e junho (primavera)

4.1.14. *Trogonophis wiegmanni*

Entre os 48 espécimes de *Trogonophis wiegmanni* analisados em coleções zoológicas, 3 eram imaturos, sendo 1 fêmea e 2 machos. Entre os espécimes adultos, amostraram-se 25 fêmeas e 20 machos, dos quais 16 fêmeas e 13 machos tinham o registro de data de coleta. O menor macho adulto amostrado apresentava 113 mm de CRC, e a menor fêmea adulta, 105 mm. As localidades de coleta dos espécimes adultos com registro de data estão apresentadas na figura 135, sobrepostas ao mapa de ecorregiões. Como se observa nesse mapa, as localidades de origem das amostras estão inseridas nas ecorregiões de Florestas e Bosques Mediterrâneos, e de Bosques Secos Mediterrâneos e Matagal Suculento de Acácias e Argões, ambas de clima mediterrâneo. Nessas regiões, os invernos são brandos, bem como os verões, devido à influência do mar.

Figura 135 – Localidades de coleta dos espécimes de *Trogonophis wiegmanni* adultos amostrados, e sua distribuição nas ecorregiões do norte da África

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

Todos os espécimes, machos e fêmeas, amostrados com data de coleta são dos meses de maio e junho (na primavera), o que impede uma análise do ciclo reprodutivo com base na variação das medidas de gônadas e vias genitais. Ainda assim, obtiveram-se dados acerca da fase reprodutiva das fêmeas, já que duas das fêmeas examinadas, coletadas nos dias 8 e 9 de junho, tinham dois embriões cada. Uma terceira fêmea amostrada tinha dois embriões nos ovidutos, porém não havia informação sobre sua data de coleta. Todas as demais fêmeas dissecadas encontravam-se em vitelogênese primária, como se observa no gráfico de dispersão da figura 136.

Figura 136 – Gráfico de dispersão dos valores de maior folículo ou ovo com embrião observado por fêmea adulta de *Trogonophis wiegmanni*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Entre os machos, não foi possível observar variações nas medidas de volume testicular ou de diâmetro dos ductos deferentes entre os dois meses amostrados (Figuras 137 e 138). Os dados apresentados no gráfico da figura 137 correspondem aos resíduos da regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal, já que essas variáveis se mostraram significativamente relacionadas ($p = 0,008$). Os dados de comprimento e diâmetro dos rins não foram analisados, uma vez que todos os espécimes que tiveram esses órgãos medidos foram coletados no mês de maio. Assim, mais dados são necessários para caracterizar a variação no tamanho dos testículos, ductos deferentes, rins e folículos ovarianos nessa espécie.

Figura 137 – Gráfico de dispersão dos valores de resíduos resultantes da análise de regressão linear entre volume testicular e comprimento rostro-cloacal de machos adultos de *Trogonophis wiegmanni*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Figura 138 – Gráfico de dispersão das medidas de diâmetro do ducto deferente de machos adultos de *Trogonophis wiegmanni*, segundo as datas de coleta dos espécimes

Foram analisadas ainda lâminas histológicas de 11 fêmeas e 15 machos de *T. wiegmanni*. As lâminas de fêmeas não contam com o registro da data de coleta do espécime, enquanto as lâminas de 12 machos têm esse dado disponível. Nas lâminas de fêmeas, foi possível observar a mesma estrutura geral dos ovidutos das demais espécies analisadas, com endométrio composto por epitélio simples e cúbico, sobre lâmina basal de tecido conjuntivo. Na porção média do oviduto, pequenas glândulas foram observadas na lâmina basal do endométrio, embora pouco desenvolvidas e não secretoras (Figura 139A). Entre as lâminas analisadas, não havia amostras de fêmeas em fase reprodutiva, motivo pelo qual não foi possível observar as glândulas endometriais em sua fase ativa. Mais cranialmente, na região posterior do infundíbulo, não foram observadas glândulas (Figura 139B). Também não há glândulas na parte posterior do oviduto, região na qual se observam dobras no endométrio (Figura 139C). Não foi observada diferenciação do segmento sexual renal nas fêmeas (Figura 139D).

Figura 139 – Cortes histológicos de fêmeas de *Trogonophis wiegmanni*

Fonte: SANTOS, L. C.

A. oviduto médio, mostrando pequenas glândulas no endométrio; B. região posterior do infundíbulo; C. oviduto posterior, mostrando dobras no endométrio; D. rim. ept: epitélio; lp: lâmina própria. Coloração: hematoxilina/eosina.

As lâminas de machos de *T. wiegmanni* que contavam com a informação de data de coleta dos espécimes abrangem os meses de março, abril, maio, junho, julho, agosto e novembro. O espécime amostrado em março, ao final do inverno, encontrava-se em fase de repouso testicular, apresentando apenas espermatogônias nos túbulos seminíferos (Figura 140 A). Em abril e maio, já na primavera, o epitélio seminífero passa a contar também com espermátócitos (Figura 140C). Até essa fase, não se observa atividade secretora no segmento sexual renal, e os ductos deferentes estão vazios (Figura 140B). Em junho, o epitélio seminífero já se apresenta em fase espermiogênica, ao mesmo tempo em que são observados espermatozóides nos ductos deferentes e os túbulos do SSR aparecem dilatados e repletos de secreção (Figuras 140 D e E). Assim como observado para *Blanus mettetalii*, a fase espermiogênica em *T. wiegmanni* é breve, e a regressão do epitélio seminífero muito rápida, uma vez que os três espécimes amostrados em julho, no início do verão, já apresentavam apenas espermatogônias em seus túbulos seminíferos (Figura 140F). Entre esses três espécimes, um ainda tinha o SSR secretor, mas seus ductos deferentes já apresentavam apenas secreção, sem que tenham sido observados espermatozóides. Os três espécimes amostrados em agosto e novembro (no verão e outono, respectivamente) mantinham seus testículos em repouso, com espermatogônias nos túbulos seminíferos, seus ductos deferentes vazios e o SSR não secretor. A fase de repouso reprodutivo nessa espécie se estende, portanto, do início do verão, em julho, até o final do inverno, sendo o desenvolvimento do epitélio seminífero retomado em abril, no início da primavera. Toda a espermatogênese e espermiogênese têm lugar durante a primavera, sendo que essa última fase não dura mais do que um mês. Essas características do ciclo reprodutivo estão resumidas no quadro 13.

Figura 140 – Cortes histológicos de machos de *Trogonophis wiegmanni*

Fonte: SANTOS, L. C., 2013

A. testículo de macho coletado em março, mostrando apenas espermatogônias nos túbulos seminíferos (espécime Tw 17); B. rim do mesmo macho da figura A, sem atividade secretora no segmento sexual renal; C. testículo de espécime de maio, com espermatogônias e espermatócitos no epitélio seminífero (espécime Tw 19); D. testículo em fase espermiogênica, com alguns túbulos seminíferos repletos de espermatozoides soltos na luz, de espécime do mês e junho (espécime Tw 5); E. rim e ducto deferente do mesmo espécime da figura D, mostrando os túbulos do segmento sexual renal dilatados e secretores, e a presença de espermatozoides no ducto deferente; F. testículo de macho coletado em julho, já com os testículos em repouso, apresentando apenas espermatogônias (espécime Tw 15). dd: ducto deferente; ssr: segmento sexual renal. Coloração em D e E: hematoxilina/eosina; coloração em A, B, C e F: tricrômico.

Quadro 13 – Quadro resumo das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *Trogonophis wiegmanni*, inferidas a partir de dados macroscópicos e histológicos

Sazonalidade do ciclo reprodutivo	Sazonal
Repouso testicular	Julho a março (verão, outono, inverno)
Desenvolvimento do epitélio seminífero	Abril e maio (primavera)
Espermio gênese	Junho (primavera)
Espermatozoides nos ductos deferentes	Junho (primavera)
Segmento sexual renal	Junho e julho (primavera e verão)
Ovos	Junho (primavera)

4.2. ANÁLISE COMPARATIVA DOS CICLOS REPRODUTIVOS

4.2.1 Sobreposição de características dos ciclos na filogenia

A partir das características dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas, inferidas por meio do exame macroscópico e microscópico das gônadas, nota-se que ocorrem diferenças, entre as espécies amostradas, quanto à duração das fases que compõem esses ciclos. Essas diferenças são observadas especialmente entre os ciclos dos machos, ao passo que as fêmeas apresentam características mais próximas quanto às fases de desenvolvimento folicular e ovulação. Como se observa na tabela 14, que resume os principais eventos dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas das espécies amostradas, de maneira geral as fêmeas apresentam ovos nos ovidutos entre setembro e janeiro, meses correspondentes à estação chuvosa, no caso das espécies com distribuição nos Cerrados, ou à primavera e início do verão (também chuvosos), para as espécies com distribuição em região de Mata Atlântica e Pampas (NIMER, 1979; AB'SÁBER, 2007). As exceções são *A. mertensi*, que apresenta um registro de ovos em junho, e *A. roberti*, com uma observação de fêmea com ovos em julho. *Trogonophis wiegmanni*, espécie do norte da África, apresentou embriões nos ovidutos em

junho, primavera no hemisfério norte. Entre as cinco espécies para as quais foi possível estimar a duração da fase final de deposição de vitelo e maior aumento folicular, três (*A. alba*, *A. dubia* e *A. microcephala*) desenvolvem essa fase no decorrer de 4 a 5 meses, entre o final do inverno e a primavera, ou entre o final da estação seca e início da chuvosa. Em outras duas espécies, *A. infraorbitale* e *A. munoai*, o acentuado aumento folicular que precede a ovulação se dá em um período mais curto, de dois meses, durante a primavera (no caso de *A. munoai*) ou ao final da estação seca (para *A. infraorbitale*). Também é importante observar que, para essas cinco espécies cuja amostra foi satisfatória para caracterizar o ciclo de crescimento folicular e ovulação, os dados sugerem sazonalidade reprodutiva e, à exceção de *A. infraorbitale*, bienalidade do ciclo.

Quanto ao ciclo dos machos, por outro lado, foram observadas espécies sazonais e outras assazonais. Como mostra a tabela 14, entre as 11 espécies brasileiras amostradas, sete (*A. dubia*, *A. infraorbitale*, *A. kingi*, *A. mertensi*, *A. microcephala*, *A. munoai* e *A. trachura*) apresentaram ciclos sazonais, enquanto quatro (*A. alba*, *A. anomala*, *A. roberti* e *A. vermicularis*) mostraram evidências de ciclos assazonais. À exceção de *A. vermicularis*, foi observada para as espécies assazonais a existência de uma fase de repouso reprodutivo, que no entanto não ocorre de maneira sincronizada entre os indivíduos, de modo que ao longo de todo o ano são amostrados machos em fase reprodutiva.

As três espécies das famílias Trogonophidae e Blanidae amostradas apresentaram evidências de ciclos sazonais para os machos. Uma vez que Trogonophidae é grupo irmão de Amphisbaenidae, e Blanidae é basal em relação ao clado formado por aquelas duas famílias (KEARNEY, STUART, 2004; MACEY et al. 2004; VIDAL et al., 2007), é possível que a sazonalidade reprodutiva seja uma característica ancestral para as Amphisbaenidae brasileiras. Quando as características de sazonalidade ou assazonalidade do ciclo de machos, inferidas para as espécies aqui analisadas são plotadas sobre a árvore filogenética de Amphisbaenidae do Brasil de Mott e Vieites (2009), nota-se que a sazonalidade está presente também no clado mais basal entre as Amphisbaenidae brasileiras, em *A. mertensi* (Figura 141). Também nessa árvore, observa-se que três das quatro espécies com machos assazonais (*A. alba*, *A. vermicularis* e *A. roberti*) estão em um mesmo grande clado. Na base do grupo irmão desse clado, está inserida *A. anomala*, também assazonal. As demais espécies do grupo que inclui *A. anomala*, no entanto, apresentaram ciclos sazonais, o que sugere que a assazonalidade pode ter surgido independentemente duas vezes entre as Amphisbaenidae brasileiras – uma em *A. anomala*, e outra no grupo que inclui *A. alba*, *A. roberti* e *A. vermicularis*.

É importante observar, nesse ponto, que a espécie inclusa na árvore de Mott e Vieites (2009) como *Amphisbaena darwini* é representante de um complexo que reúne um conjunto de espécies cuja diagnose ainda está sendo resolvida (PEREZ, 2012). O espécime utilizado na análise filogenética desses autores corresponde a uma *Amphisbaena trachura*, coletada na mesma região de proveniência dos espécimes aqui estudados. Assim, os dados de ciclo reprodutivo referentes a *Amphisbaena trachura* estão plotados sobre o ramo nomeado "*A. darwini*". Cabe observar ainda que para a plotagem dos dados de *A. microcephala*, que na análise de Mott e Vieites se mostrou um grupo parafilético, considerou-se o ramo do espécime do estado de São Paulo amostrado pelos autores. Os estados de origem dos espécimes desse cladograma estão identificados pelas siglas em frente aos nomes das espécies.

Tabela 14 – Tabela sinóptica dos principais eventos do ciclo reprodutivo das espécies analisadas

Espécie	Sazonalidade		Repouso testicular	Desenvolvimento do epitélio seminífero	Espermiogênese	Espermatozóides nos ductos deferentes	SSR secretor	Crescimento folicular final	Ovos
	Machos	Fêmeas							
<i>A. alba</i>	assazonal	Sazonal, bienal	não sincrônico	ao longo do ano	ao longo do ano	ao longo do ano	ao longo do ano	julho a outubro	outubro
<i>A. anomala</i>	assazonal	D. I.	não sincrônico	ao longo do ano	ao longo do ano	ao longo do ano	ao longo do ano	D. I.	D. I.
<i>A. dubia</i>	sazonal	sazonal, bienal	setembro a dezembro	janeiro a abril	maio a agosto	maio a novembro	maio a novembro	julho a outubro	novembro e dezembro
<i>A. infraorbitale</i>	sazonal, bienal	sazonal	a partir de outubro	D. I.	maio a agosto	julho a agosto	junho a agosto	julho e agosto	setembro e outubro
<i>A. kingi</i>	sazonal	Sazonal, bienal	dezembro e janeiro	maio a julho	agosto a outubro	setembro e outubro	setembro e outubro	D. I.	novembro e janeiro
<i>A. mertensi</i>	sazonal	D. I.	janeiro a abril	maio e junho	junho a novembro	outubro a dezembro	outubro a dezembro	D. I.	junho e outubro
<i>A. microcephala</i>	sazonal	sazonal, bienal	novembro a abril	maio a agosto	setembro e outubro	setembro a dezembro	setembro a novembro	agosto a dezembro	dezembro e janeiro
<i>A. munoai</i>	sazonal, anual	sazonal, bienal	janeiro a maio	junho e julho	agosto a novembro	outubro a dezembro	agosto a dezembro	outubro e novembro	novembro e dezembro
<i>A. roberti</i>	assazonal	D. I.	não sincrônico	ao longo do ano	ao longo do ano	ao longo do ano	ao longo do ano	D. I.	julho
<i>A. trachura</i>	sazonal	D. I.	abril a junho	entre julho e fevereiro	entre julho e outubro	entre julho e fevereiro	entre julho e outubro	D. I.	novembro
<i>A. vermicularis</i>	assazonal	D. I.	D. I.	ao longo do ano	ao longo do ano	ao longo do ano	ao longo do ano	D. I.	D. I.
<i>B. cinereus</i>	sazonal	D. I.	D. I.	D. I.	provavelmente maio e junho	provavelmente maio e junho	provavelmente maio e junho	D. I.	D. I.
<i>B. mettetalii</i>	sazonal	D. I.	agosto a março	abril	maio e junho	maio e junho	maio e junho	D. I.	D. I.
<i>T. wiegmanni</i>	sazonal	Sazonal, bienal	julho a março	abril e maio	junho	junho	junho e julho	D. I.	junho

D. I.: dados insuficientes.

Figura 141 – Cladograma de Amphisbaenidae do Brasil, modificado de Mott e Vieites (2009), mostrando a distribuição das espécies com ciclos reprodutivos sazonais e assazonais em machos. As siglas em frente aos nomes das espécies indicam os estados de origem das amostras utilizadas pelos autores, informação que foi considerada para a plotagem do dado referente a *Amphisbaena microcephala*, parafilético segundo essa análise.

Modificado de Mott e Vieites (2009).

Uma diferença que pode ser percebida entre as Amphisbaenidae brasileiras e as espécies de Blanidae e Trogonophidae é a maior duração da fase espermiogênica. Em *T. wiegmanni* e *B. mettetali*, das quais puderam ser analisadas lâminas histológicas, a produção de espermatozóides é muito rápida, se limitando a um único mês, no caso da primeira espécie, e dois meses, na segunda espécie. Em *B. cinereus*, apesar de não terem sido analisados cortes histológicos, o rápido aumento do volume testicular sugere que, também nessa espécie, haja uma curta fase espermiogênica, entre maio e junho. Entre as Amphisbaenidae, por outro lado, foram observadas fases espermiogênicas mais longas. No clado mais basal desse grupo, os machos de *A. mertensi* mantêm-se produzindo espermatozóides ao longo de seis meses. A fase espermiogênica mais curta entre as demais Amphisbaenidae amostradas foi observada em *A. microcephala*, que produz espermatozóides por dois meses. Ainda no clado no qual se insere *A. microcephala*, as espécies amostradas se mantêm espermiogênicas por três a quatro meses, como se observa no cladograma da figura 142. Contudo, as mais longas fases espermiogênicas entre as Amphisbaenidae amostradas se observam entre as espécies com machos assazonais, também assinaladas na figura 142. Nessas espécies, apesar de ainda não ser possível dizer por quanto tempo um indivíduo se mantém espermiogênico antes de passar por um intervalo de repouso reprodutivo, é provável que a fase de produção de espermatozóides se estenda por até um ano.

Ao mesmo tempo em que se observam fases espermiogênicas mais longas entre as Amphisbaenidae, tornam-se mais curtas nesse grupo as fases de repouso testicular, durante as quais o epitélio seminífero permanece quiescente, exibindo apenas espermatogônias. Enquanto *B. mettetali* e *T. wiegmanni* mantêm-se em repouso testicular ao longo de oito e nove meses, respectivamente, a duração dessa fase entre as Amphisbaenidae brasileiras sazonais varia entre dois meses, em *A. kingi*, e seis meses, em *A. microcephala*. A tabela 15 resume a duração, nas espécies que tiveram suas gônadas examinadas por meio de microscopia de luz, das fases de repouso testicular, espermiogênese, presença de espermatozóides nos ductos deferente e atividade secretora do segmento sexual renal. Esses dados são aproximados no caso de *A. trachura*, espécie para a qual o ciclo espermiogênico não pôde ser satisfatoriamente esclarecido.

Figura 142 – Cladograma de Amphisbaenidae do Brasil, modificado de Mott e Vieites (2009), mostrando a duração em meses da fase espermiogênica em cada espécie amostrada.

Cores iguais assinalam fases espermiogênicas de mesma extensão.

As espécies cujos machos são assazonais estão sinalizadas com a letra A.

Tabela 15 – Tabela sinóptica da duração, em meses, de fases representativas do ciclo reprodutivo das espécies amostradas

Espécie	Duração da fase de repouso testicular	Duração da fase espermiogênica	Duração da fase de estocagem de esperma (machos)	Diferença de fase: espermiogênese / ovulação	Duração da fase secretora do SSR
<i>A. alba</i>	Repouso assincrônico (ciclo assazonal)	12 meses	12 meses	0	12 meses
<i>A. anomala</i>	Repouso assincrônico (ciclo assazonal)	12 meses	12 meses	0	12 meses
<i>A. dubia</i>	4 meses	4 meses	7 meses	2 a 3 meses	7 meses
<i>A. infraorbitale</i>	D. I.	4 meses	3 meses	1 mês	3 meses
<i>A. kingi</i>	2 meses	3 meses	2 meses	1 mês	2 meses
<i>A. mertensi</i>	4 meses	6 meses	3 meses	0	3 meses
<i>A. microcephala</i>	6 meses	2 meses	4 meses	2 meses	3 meses
<i>A. munoai</i>	5 meses	4 meses	3 meses	1 mês	5 meses
<i>A. roberti</i>	Repouso assincrônico (ciclo assazonal)	12 meses	12 meses	0	12 meses
<i>A. trachura</i>	3 meses	4 meses?	8 meses?	D. I.	4 meses?
<i>A. vermicularis</i>	D. I.	12 meses	12 meses	0	12 meses
<i>B. mettetalii</i>	8 meses	2 meses	2 meses	D. I.	2 meses
<i>T. wiegmanni</i>	9 meses	1 mês	1 mês	0	2 meses

SSR: segmento sexual renal.

Também na tabela 15, estão apresentados para cada espécie os períodos decorrentes entre o final da fase espermiogênica e a época de ovulação nas fêmeas. Como fica evidente na figura 143, essa diferença de fase ocorre apenas no clado que aparece como grupo-irmão de *Amphisbaena anomala* e *Amphisbaena sp.*. Nessas espécies, há um intervalo de um a dois meses entre o fim da produção de espermatozóides e a ovulação, e uma fase de estocagem de esperma tem lugar entre esses dois eventos. Nas demais espécies amostradas, incluindo *T. wiegmanni*, são observados ovos nos ovidutos das fêmeas em meses nos quais ainda há produção de espermatozóides pelos machos. Cabe aqui observar que, apesar de não terem sido observadas fêmeas de *A. anomala* e *A. vermicularis* com ovos nos ovidutos, o ciclo dos machos dessas espécies é assazonal, o que permite dizer que não há diferença de fase entre a espermiogênese e a ovulação. Já *A. trachura*, espécie para a qual há dúvidas quanto à época e duração das fases da espermatogênese, não foi incluída na figura 143.

Assim como observado em relação à duração da fase espermiogênica, a extensão do período no qual são observados espermatozóides nos ductos deferentes é maior nas espécies de Amphisbaenidae analisadas, em comparação ao que se observa em *B. mettetali* e *T. wiegmanni*. Como mostrado nas tabelas 14 e 15 e na figura 144, as duas espécies do norte da África só apresentam espermatozóides nos ductos deferentes durante um a dois meses, enquanto há atividade espermiogênica nos testículos. Entre as espécies brasileiras, com a maior duração da fase espermiogênica, se prolonga também o período de observação de espermatozóides nesses ductos. Nas espécies em que a fase de ovulação nas fêmeas ocorre quando já não há espermiogênese nos machos, é especialmente importante a ocorrência dessa manutenção dos espermatozóides nos ductos. A espécie de ciclo sazonal para a qual foi observado o mais longo período de manutenção de espermatozóides nos ductos deferentes (7 meses), *A. dubia*, é também a que apresenta o maior intervalo entre o fim da espermiogênese e a fase de ovulação (2 a 3 meses). Infelizmente, essa espécie não foi incluída na análise filogenética de Mott e Vieites (2009).

Figura 143 – Cladograma de Amphisbaenidae do Brasil, modificado de Mott e Vieites (2009), mostrando a diferença de fase, em meses, entre o fim da espermiogênese nos machos e a ovulação nas fêmeas

Círculos de cores iguais assinalam valores iguais de diferença de fase.

Figura 144 – Cladograma de Amphisbaenidae do Brasil, modificado de Mott e Vieites (2009), mostrando a duração, em meses, do período no qual são observados espermatozoides nos ductos deferentes dos machos de cada espécie amostrada

Cores iguais assinalam fases de estocagem de espermatozoides de mesma extensão.

4.2.2 Sazonalidade dos ciclos reprodutivos de machos e sazonalidade climática

Com base na caracterização dos ciclos reprodutivos das Amphisbaenidae brasileiras, as mesmas foram separadas quanto à sazonalidade ou assazonalidade dos ciclos dos machos, e plotadas segundo as localidades de coleta dos espécimes amostrados em mapas com dados de sazonalidade climática, do banco de dados WorldClim ®. As espécies foram separadas considerando-se as características dos ciclos dos machos uma vez que, como já exposto, não foram observadas evidências de assazonalidade para as fêmeas das espécies amostradas. Os mapas da figura 145 mostram, separadamente, as localidades de coleta das espécies com ciclos sazonais e assazonais, sobre um mapa de gradação de sazonalidade de precipitação. A medida de sazonalidade de precipitação é baseada nos dados de desvio padrão das médias mensais dessa variável. Pode-se observar, nesses mapas, que as espécies com ciclos sazonais ocorrem em regiões com menor variação anual de precipitação, à exceção de *A. infraorbitale* e de uma parte das *A. mertensi*. Ao mesmo tempo, as espécies para as quais são observados machos espermiogênicos ao longo de todo o ano se distribuem em regiões com maior variação sazonal na precipitação. Assim, o ciclo anual de chuvas não parece ser um fator limitante no ciclo reprodutivo de machos dessas espécies.

Por outro lado, observamos nos mapas da figura 146 que as espécies assazonais não estendem suas áreas de ocorrência para regiões com maior variação de temperaturas ao longo do ano. Esse padrão pode apontar o ciclo anual de temperaturas como um fator limitante para a distribuição de espécies com ciclos assazonais. Ao mesmo tempo, quando se observa a distribuição das espécies com ciclos sazonais, nota-se que *A. infraorbitale* foi amostrada exclusivamente em uma região com pouca variação anual de temperaturas. Esse ciclo ambiental, portanto, não parece ser limitante para as espécies com ciclo reprodutivo sazonal.

Figura 145 – Mapas de distribuição das localidades de coleta das espécies com ciclos reprodutivos assazonais (A) e sazonais (B), sobre gradiente de sazonalidade de precipitação

Fonte: Santos, L. C., 2013

Figura 146 – Mapas de distribuição das localidades de coleta das espécies com ciclos reprodutivos assazonais (A) e sazonais (B), sobre gradiente de sazonalidade de temperatura

Fonte: Santos, L. C., 2013

4.3 FECUNDIDADE

Dentre as 13 espécies de *Amphisbaenia* amostradas para dissecção, obtiveram-se dados de ovos ou embriões para 10 espécies, das famílias Amphisbaenidae e Trogonophidae. Não foram observadas fêmeas de *Amphisbaena anomala*, *Amphisbaena vermicularis* e *Blanus cinereus* com ovos nos ovidutos. A tabela 16 resume o número de fêmeas com ovos amostradas por espécie, bem como os números máximo e mínimo de ovos encontrados por fêmea. Pode-se observar, por essa tabela, que a maioria das espécies aqui amostradas apresentaram até 4 ovos nos ovidutos. Os maiores números de ovos por fêmea foram observados em *Amphisbaena alba*, *Amphisbaena trachura* e *Amphisbaena mertensi* – com números máximos de cinco, nove e sete ovos por fêmea, respectivamente.

Tabela 16 – Números máximo e mínimo de ovos observados por fêmea, e número de fêmeas grávidas amostrado por espécie

Espécie	N	número mínimo de ovos	número máximo de ovos
<i>Amphisbaena alba</i>	1	5*	5*
<i>Amphisbaena anomala</i>	0	**	**
<i>Amphisbaena dubia</i>	4	1	3
<i>Amphisbaena infraorbitale</i>	17	2	4
<i>Amphisbaena kingi</i>	2	1	2
<i>Amphisbaena mertensi</i>	2	6	7
<i>Amphisbaena microcephala</i>	2	1	4
<i>Amphisbaena munoai</i>	10	2	3
<i>Amphisbaena roberti</i>	0	1*	1*
<i>Amphisbaena trachura</i>	1	9*	9*
<i>Amphisbaena vermicularis</i>	0	**	**
<i>Blanus cinereus</i>	0	**	**
<i>Trogonophis wiegmanni</i>	3	2	2

*Apenas uma fêmea com ovos foi observada.

**Não foram observadas fêmeas com ovos.

Entre as *Amphisbaena alba*, apenas uma fêmea foi amostrada com ovos nos ovidutos. Esse espécime (UFMT 3312), coletado em 8 de outubro de 2002 na usina hidrelétrica de Guaporé (MT), tinha 5 ovos nos ovidutos, sendo dois do oviduto direito e três no esquerdo. Esses ovos tinham entre 33,26 e 39,57 mm de comprimento, com média de 36,26 mm ($\pm 2,34$), e volume médio de 1991,93 mm³ ($\pm 227,01$). Todos os ovos se dispunham de maneira enfileirada na cavidade abdominal da fêmea (Figura 147), de modo que não foram notadas deformações evidentes no diâmetro do corpo do espécime na altura em que os ovos de acomodavam.

Além desse espécime, uma fêmea de *A. alba* foi amostrada com folículos aumentados nos ovários (ZUEC 225). A mesma foi coletada no mês de outubro, em Campinas (SP), e apresentava 11 folículos elipsóides em estágio avançado de deposição de vitelo, sendo cinco no ovário direito e seis no esquerdo. O comprimento desses folículos variou entre 21,96 e 30,77, com média 27,46 ($\pm 2,26$). Já o diâmetro médio foi de 15,50 ($\pm 1,14$). Diferente do observado em relação aos ovos da fêmea UFMT 3312, os folículos desse espécime se dispunham lado a lado. O CRC dessa segunda fêmea de *A. alba* (650 mm) era muito maior do que o da fêmea observada com 5 ovos nos ovidutos (383 mm).

Figura 147 – Fêmeas de *Amphisbaena alba* com ovos nos ovidutos ou folículos ovarianos aumentados

Fonte: SANTOS, L.C., 2013

A. Fêmea UFMT 3312, mostrando cinco ovos enfileirados na cavidade abdominal, sendo dois no oviduto direito e três no esquerdo; B. Fêmea ZUEC 225, com 11 folículos em fase final de deposição de vitelo, dispostos lado a lado na cavidade abdominal.

Entre as *A. dubia*, foram observadas quatro fêmeas com ovos nos ovidutos (CRIB 393, CRIB 410, CRIB 384 e CRIB 409), todas previamente dissecadas, e com datas de coleta entre 22 de novembro e 21 de dezembro. Duas delas (com comprimento rostro-cloacal de 235 mm e 242 mm) apresentavam três ovos, sendo que a primeira os tinha todos no oviduto direito, e a segunda tinha um ovo no oviduto direito e outros dois, já removidos, num saco plástico à parte. Outra fêmea, com 248 mm de CRC, possuía dois ovos, sendo um em cada oviduto. Uma quarta fêmea, com o maior comprimento rostro-cloacal medido entre as fêmeas grávidas da espécie (269 mm), apresentava apenas um ovo solto na cavidade abdominal. O número de fêmeas amostradas com ovos é baixo para viabilizar testes de correlação razoáveis entre o CRC desses indivíduos e o número de ovos apresentados por cada um, mas é digno de nota que a fêmea amostrada com apenas um ovo tivesse o maior CRC entre esses espécimes, e a fêmea com maior CRC apresentasse três ovos nos ovidutos. Todos os ovos observados eram alongados, de formato elipsóide, e de dispunham em linha naquelas fêmeas com mais de um ovo na cavidade abdominal. O volume dos mesmos não foi medido, já que boa parte desses ovos se encontrava danificada, o que torna não confiáveis as medidas de diâmetro dessas estruturas. Os números de ovos amostrados por fêmea, bem como o comprimento dos mesmos e as medidas de CRC das mães estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17 – Número e comprimento dos ovos observados em fêmeas de *Amphisbaena dubia*

Espécime	CRC	Número de ovos	Comprimento dos ovos
CRIB 393	235	3	30,67 / 28,67 / 28,73
CRIB 410	248	2	31,28 / 26,58
CRIB 384	242	3	30,73 / 30,42 / 26,23
CRIB 409	269	1	31,54

Entre as fêmeas de *A. infraorbitale* amostradas, 17 apresentavam ovos nos ovidutos, o que possibilitou análises de regressão linear entre o comprimento rostro-cloacal de cada fêmea e número e volume total de seus ovos. Todos esses 17 espécimes foram coletados entre 3 de setembro e 4 de outubro de 2002, na usina hidrelétrica de Guaporé, no estado de Mato Grosso. Como se pode observar no histograma de frequência da figura 148, o menor número

de ovos observado em uma fêmea, e também o mais frequente, foi 2, e o maior número, observado em apenas uma fêmea, foi 4. A distribuição dos ovos entre os ovidutos direito e esquerdo é, na maioria das vezes, simétrica. Nas fêmeas com dois ou quatro ovos, os mesmos se dividem em números iguais entre os dois ovidutos, à exceção de três espécimes, dos quais uma tinha seus dois únicos ovos no oviduto direito, e outras duas tinham ambos os ovos no oviduto esquerdo. Nas fêmeas com três ovos, ambos os ovidutos sempre apresentaram pelo menos um ovo.

Figura 148 – Histograma de frequência do número de ovos observado por fêmea de *Amphisbaena infraorbitale*

Segundo análise de regressão linear, o número de ovos encontrado por fêmea está significativamente relacionado ao CRC desses indivíduos ($p = 0,004$, $R^2 = 0,438$), como ilustrado pelo gráfico de dispersão da figura 149. Da mesma forma, o volume total ocupado pelos ovos na cavidade abdominal das fêmeas também está significativamente relacionado ao CRC das mesmas ($p < 0,001$, $R^2 = 0,619$) (Figura 150). Em todas as fêmeas amostradas, os ovos se dispunham em fila na cavidade abdominal (Figura 151).

Figura 149 – Gráfico de dispersão mostrando a relação entre o número de ovos observados por fêmea de *Amphisbaena infraorbitale* e o comprimento rostro-cloacal desses espécimes ($p = 0,004$, $R^2 = 0,438$)

Figura 150 – Gráfico de dispersão mostrando a relação entre a soma dos volumes dos ovos observados por fêmea de *Amphisbaena infraorbitale* e o comprimento rostro-cloacal desses espécimes ($p = 0,004$, $R^2 = 0,438$)

Figura 151 – Fêmea de *Amphisbaena infraorbitale* com dois ovos nos ovidutos, dispostos de maneira enfileirada (UFMT 3429)

Fonte: SANTOS, L.C., 2013

Apenas duas das fêmeas de *Amphisbaena kingi* amostradas apresentavam ovos nos ovidutos. A primeira, coletada em 23 de novembro de 2004 em São Jerônimo (RS), e com 210 mm de CRC, havia sido previamente dissecada e seus dois ovos removidos dos ovidutos, se encontrando soltos na cavidade abdominal. Esses ovos mediam 27,09 e 26,05 mm de comprimento. A segunda fêmea, por sua vez, apresentava um único ovo no oviduto esquerdo, com comprimento de 21,87 mm – menor, portanto, do que os observados na primeira fêmea. Esse indivíduo tinha um menor comprimento rostro-cloacal (192 mm), e foi coletado em 1º de fevereiro de 2005 em Palmares do Sul (RS).

Também entre as *Amphisbaena mertensi*, apenas duas das fêmeas amostradas tinham ovos nos ovidutos. Uma delas (MNRJ 20973), coletada em Botucatu (SP) em 27 de outubro de 1982, tinha seis ovos, sendo três em cada oviduto. O comprimento médio desses ovos é de 26,06 mm ($\pm 2,24$). A segunda fêmea amostrada, de comprimento rostro-cloacal maior (410 mm, contra 356 mm da fêmea MNRJ 20973), foi coletada em Campo Mourão (PR) em 10 de junho de 1986 (MHNCI 3866). Esse espécime tinha sete ovos, sendo quatro no oviduto direito e três no oviduto esquerdo, com comprimento médio de 25,58 mm ($\pm 10,39$) – semelhante, portanto, ao comprimento médio observado na primeira fêmea. Em ambos os espécimes, os ovos se dispunham de maneira enfileirada na cavidade abdominal (Figura 152), e antes da

dissecção não era possível notar distensões evidentes no diâmetro do corpo na região onde se localizam os ovidutos.

Figura 152 – *Amphisbaena mertensi* fêmeas, com ovos nos ovidutos, alinhados em linha

Fonte: SANTOS, L.C., 2013

A. Fêmea MHNCI 3866, com sete ovos nos ovidutos; B. fêmea MNRJ 20973, com seis ovos nos ovidutos. Barra de escala: 10 mm.

Entre as fêmeas de *Amphisbaena microcephala* analisadas, foram encontradas duas com ovos nos ovidutos, ambas já previamente dissecadas. A primeira, coletada em Itirapina (SP) em 17 de janeiro de 2002, possuía apenas um ovo no oviduto esquerdo, com 41,57 mm de comprimento. Essa fêmea apresentava 348 mm de comprimento rostro-cloacal, e tinha o número de identificação provisório ITS 105 (esse espécime seria tombado na coleção CRIB, mas foi perdido no incêndio de maio de 2010 na coleção herpetológica do Instituto Butantan). Já a fêmea UFMT 3550, de comprimento rostro-cloacal menor em relação ao espécime acima mencionado (285 mm), contava com 4 ovos nos ovidutos, sendo dois em cada oviduto. O comprimento médio desses ovos é de 34,94 mm ($\pm 5,05$). Esse espécime foi coletado no município de Garça (SP), em 11 de dezembro de 2002 e, assim como observado nas espécies apresentadas acima, tinha seus ovos dispostos em fila.

Para as *Amphisbaena munoai*, obtiveram-se dados de 10 fêmeas com ovos nos ovidutos. Todas já haviam sido previamente dissecadas, e seus ovidutos seccionados, de modo que os ovos se encontravam, em sua maioria, soltos na cavidade abdominal, tornando difícil dizer quantos ovos se localizavam nos ovidutos direito e esquerdo. No caso do espécime MCP 15802, não foi mesmo possível dizer quantos ovos essa fêmea apresentava, já que seu oviduto direito havia sido completamente removido. Assim, só é possível afirmar que

esse indivíduo tinha ao menos um ovo, localizado no oviduto esquerdo. Entre as demais fêmeas, sete apresentavam dois ovos, e duas, três ovos. Nos espécimes cujos ovidutos estavam intactos, observaram-se ovos em ambos os ovidutos.

Nessa espécie, diferente do que foi observado em *A. infraorbitale*, o número de ovos por fêmea não se mostrou significativamente relacionado ao CRC das mesmas, segundo análise de regressão linear ($p = 0,101$; $R^2 = 0,338$). Da mesma forma, a relação entre o CRC e o volume total ocupado pelos ovos também não é significativa ($p = 0,457$; $R^2 = 0,095$). Os gráficos de dispersão das figuras 153 e 154 ilustram essas análises de regressão, e o segundo evidencia uma fêmea com volume dos ovos destacadamente alto para seu CRC. Como se observa na figura 155, essa fêmea (MCP 12070) tinha a porção posterior da cavidade abdominal quase toda ocupada por três ovos, ficando o intestino comprimido lateralmente.

Figura 153 – Gráfico de dispersão mostrando a relação entre o número de ovos observados por fêmea de *Amphisbaena munoai* e o comprimento rostro-cloacal desses espécimes ($p = 0,457$; $R^2 = 0,095$)

Figura 154 – Gráfico de dispersão mostrando a relação entre a soma dos volumes dos ovos observados por fêmea de *Amphisbaena munoai* e o comprimento rostro-cloacal desses espécimes ($p = 0,101$; $R^2 = 0,338$)

Figura 155 – Fêmea de *Amphisbaena munoai*, mostrando ovos em fila, ocupando boa parte da porção posterior da cavidade abdominal e deixando o intestino comprimido lateralmente (*) (MCP 12070)

Fonte: SANTOS, L.C., 2013

Entre as *Amphisbaena roberti* analisadas, apenas uma fêmea, coletada em Palmas (TO) em 17 de julho de 1999, apresentava ovos – um em cada oviduto. Esses ovos têm 22,67 e 23,32 mm de comprimento, e a fêmea tem CRC de 171 mm.

Da mesma forma, também foi amostrada apenas uma fêmea de *Amphisbaena trachura* grávida. Esse espécime, coletado em 18 de novembro de 1993 em Cachoeira do Sul (RS), apresentava seis ovos no oviduto direito e três no esquerdo, sendo esse o maior número de ovos observado entre as espécies aqui amostradas. A fêmea em questão apresenta 367 mm de CRC, e o comprimento médio dos folículos é de 25,88 mm ($\pm 3,76$). O volume médio de cada ovo é de 680,52 mm³ ($\pm 97,63$), ao passo que o volume total ocupado por eles é de 6124,67 mm³. Também chama a atenção nessa fêmea o fato de ser a única entre as espécies analisadas a apresentar os ovos dispostos lado a lado, como mostra a figura 156.

Figura 156 – *Amphisbaena trachura* fêmea, mostrando nove ovos nos ovidutos, dispostos lado a lado na cavidade abdominal (MCP 5764)

Fonte: SANTOS, L.C., 2013

Finalmente, foram amostradas três fêmeas de *Trogonophis wiegmanni* com ovos nos ovidutos. Os três espécimes apresentavam dois ovos cada, e em todos foi possível observar embriões em desenvolvimento. Duas dessas fêmeas foram coletadas nas Ilhas Chafarinas, na costa do Marrocos, em 8 e 9 de julho de 1978, e tinham os dois embriões no oviduto direito. No espécime MNCN 11484, com CRC de 132 mm, os ovos tinham comprimento de 28,17

mm e 32,44 mm, ao passo que os respectivos embriões tinham 11,49 e 9,43 mm. O espécime MNCN 11483, por sua vez, apresentava 133 mm de CRC, e dois ovos de 16,65 mm e 19,71 mm de comprimento, cujos embriões não puderam ser medidos devido a seu estado de conservação. A terceira fêmea não possuía registro de data ou localidade de coleta, sendo a única informação constante em seu rótulo a procedência "África". Esse espécime tinha os órgãos pobremente conservados, o que tornou impossível dizer em que oviduto estava cada um dos embriões, que apesar disso estavam em estado razoável de preservação. Esses embriões se encontravam em um estágio avançado de desenvolvimento, já com as escamas formadas e pigmentadas (Figura 157). Os embriões das duas fêmeas coletadas em julho por sua vez, se encontravam em um estágio mais precoce do desenvolvimento, sem as escamas evidentes (Figura 158).

Figura 157 – Embrião de *Trogonophis wiegmanni* em estágio avançado de desenvolvimento, apresentando escamas pigmentadas

Embrião observado na fêmea MNHN 1907.0200. Foto: Ivan Ineich.

Figura 158 – *Trogonophis wiegmanni* fêmea com dois ovos no oviduto direito (MNCN 11484). Um dos ovos foi virado para evidenciar o embrião.

Fonte: SANTOS, L.C., 2013

4.4 DIMORFISMO SEXUAL

Para as análises de dimorfismo sexual, os dados de *Amphisbaena alba*, *A. microcephala*, *A. trachura* e *A. mertensi* tiveram seus dados divididos em grupos amostrais, levando em conta a distribuição das localidades de coleta dos espécimes nos biomas e ecorregiões brasileiras, seguindo a organização feita para as análises de ciclo reprodutivo apresentadas na seção 4.1. Nesses casos, as análises foram feitas também para a amostra completa, incluindo os dados de todos os espécimes adultos amostrados. Para as análises das medidas de *A. roberti*, foram utilizados apenas os dados de espécimes de São Paulo e Goiás, da mesma forma como foi feito para as análises de ciclo reprodutivo. Os espécimes de Tocantins (2 machos e 4 fêmeas) não foram incluídos nessa análise.

A tabela 18 resume os valores p obtidos das análises ANOVA para comparação das médias de comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento caudal (CC), diâmetro do corpo (DC) e da razão DC/CRC entre machos e fêmeas, bem como a média e o número amostral de cada variável obtidos para machos e fêmeas. Precedendo a ANOVA, as variáveis foram testadas quanto à homocedasticidade e normalidade. Não foram observadas amostras com variâncias desiguais, mas alguns grupos de dados não tinham distribuições normais. Nesses

casos, os dados foram submetidos a transformação logarítmica. Algumas dessas variáveis, no entanto, não se adequaram à distribuição normal, motivo pelo qual o resultado dessas análises deve ser considerado com cautela. Esses resultados estão marcados com notas na tabela 18. Para 5 espécies (*A. alba*, *A. dubia*, *A. vermicularis*, *B. cinereus* e *T. wiegmanni*), não foram observadas diferenças significativas entre os sexos para qualquer das variáveis analisadas.

Foi observada diferença significativa de CRC entre machos e fêmeas de *A. kingi*, *A. munoai*, *A. trachura*, *A. roberti*, e na amostra completa de *A. mertensi*. Em todos esses casos, as fêmeas apresentaram médias de comprimento maiores do que os machos. Os dados de *A. trachura*, no entanto, não apresentaram distribuição normal. Em *A. infraorbitale*, por outro lado, os machos mostraram CRC significativamente maior em relação às fêmeas, assim como o comprimento da cauda. Um maior comprimento da cauda nos machos foi observado também em *A. anomala*, embora esses dados não tenham distribuição normal. Nenhuma espécie apresentou diferença significativa no diâmetro do corpo entre machos e fêmeas, e a razão DC/CRC só se mostrou significativamente diferente entre os sexos na amostra de *A. microcephala* coletada nos estados do Paraná e Santa Catarina, cujos machos apresentaram maiores valores dessa variável. No entanto, o baixo número amostral nesse caso (10 machos e 7 fêmeas) pode ter comprometido a análise.

Tabela 18 – Médias, desvios-padrão (DP) e valores p obtidos em análise de variância, para comparação das medidas de comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento caudal (CC), diâmetro do corpo (DC) e razão entre diâmetro do corpo e comprimento rostro-cloacal de machos e fêmeas. O número amostral (N) de cada grupo também é mostrado.

(continua)

Espécie	Amostra	Variável	Sexo	N	Média	DP	p
<i>A. alba</i>	Cerrado e Matas de Chiquitano	CRC	♀	25	464,68	80,08835	0,695**
			♂	41	457,0488	73,82511	
		CC	♀	25	35,9568	5,30609	0,531*
			♂	41	35,1461	4,9221	
		DC	♀	13	19,3823	2,87781	0,157
			♂	28	21,2993	4,34972	
		DC/CRC	♀	13	0,0428	0,00518	0,149*
			♂	28	0,0453	0,00536	
	Mata Atlântica	CRC	♀	10	512,1	63,40426	0,157
			♂	7	466	61,96773	
		CC	♀	10	34,96	4,05302	0,752
			♂	7	35,6343	4,53065	
		DC	♀	5	25,158	4,71656	0,27
			♂	7	22,5557	3,05596	
		DC/CRC	♀	5	0,0468	0,00282	0,307
			♂	7	0,0484	0,00248	
	Total	CRC	♀	38	480,0526	75,06284	0,222*
			♂	52	461,5577	69,90061	
		CC	♀	38	35,8895	5,14845	0,887*
			♂	52	35,7567	5,07898	
		DC	♀	21	20,8795	4,32702	0,51
			♂	39	21,6077	3,90493	
<i>A. anomala</i>		CRC	♀	19	268,5263	22,37898	0,827**
			♂	23	267	22,34238	
		CC	♀	11	17,9736	4,8819	0,044**
			♂	19	20,8068	2,52517	
		DC	♀	18	10,3561	0,95604	0,388
			♂	20	10,683	1,29975	
		DC/CRC	♀	18	0,0391	0,00354	0,675
			♂	20	0,0397	0,00496	

Tabela 18 – Médias, desvios-padrão (DP) e valores p obtidos em análise de variância, para comparação das medidas de comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento caudal (CC), diâmetro do corpo (DC) e razão entre diâmetro do corpo e comprimento rostro-cloacal de machos e fêmeas. O número amostral (N) de cada grupo também é mostrado.

(continuação)

Espécie	Amostra	Variável	Sexo	N	Média	DP	p
<i>A. dubia</i>	CRC		♀	22	262,6364	19,03767	0,052
			♂	23	250,6522	21,04456	
	CC		♀	22	21,9332	1,93484	0,777
			♂	23	21,7713	1,87169	
	DC		♀	10	7,369	0,90203	0,722
			♂	11	7,23	0,86348	
	DC/CRC		♀	10	0,0279	0,00447	0,512
			♂	11	0,029	0,00255	
	CRC		♀	34	399,9706	43,36839	0,032
			♂	19	425,7368	35,22285	
<i>A. infraorbitale</i>	CC		♀	34	16,31	2,49589	0,007*
			♂	19	18,3347	2,58376	
	DC		♀	9	21,4033	3,71798	0,165
			♂	7	18,9386	2,75247	
	DC/CRC		♀	9	0,0505	0,00402	0,052
			♂	7	0,0465	0,00344	
<i>A. kingi</i>	CRC		♀	31	207,6774	12,86957	0,018
			♂	17	198,4118	11,75297	
	CC		♀	29	22,41	3,4899	0,894**
			♂	15	22,2787	2,0872	
<i>A. mertensi</i>	CRC		♀	28	352,1786	50,00671	0,069
			♂	31	330,7097	38,68953	
	CC		♀	16	50,1019	4,84181	0,269**
			♂	27	46,8511	10,94438	
	DC		♀	25	10,626	1,89167	0,233
			♂	23	10,0491	1,33938	
	DC/CRC		♀	25	0,0303	0,00483	0,962
			♂	23	0,0303	0,00304	
	CRC		♀	29	352,4828	49,13293	0,019
			♂	35	325,0857	41,61403	
	CC		♀	17	47,9282	10,11425	0,389**
			♂	31	44,9355	12,04494	
	DC		♀	26	10,65	1,85749	0,079
			♂	27	9,837	1,42427	
	DC/CRC		♀	26	0,0303	0,00474	0,958
			♂	27	0,0304	0,00282	

Tabela 18 – Médias, desvios-padrão (DP) e valores p obtidos em análise de variância, para comparação das medidas de comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento caudal (CC), diâmetro do corpo (DC) e razão entre diâmetro do corpo e comprimento rostro-cloacal de machos e fêmeas. O número amostral (N) de cada grupo também é mostrado.

(continuação)

Espécie	Amostra	Variável	Sexo	N	Média	DP	p
<i>A. microcephala</i>	São Paulo	CRC	♀	35	251,3714	44,20413	0,099
			♂	38	333,9737	44,75005	
		CC	♀	35	20,0763	3,23912	0,184
			♂	37	19,0681	3,13767	
		DC	♀	9	11,9511	2,93776	0,661
			♂	16	11,4738	2,36704	
		DC/CRC	♀	9	0,0364	0,00419	0,902
			♂	16	0,0362	0,00481	
	Paraná e Santa Catarina	CRC	♀	7	311,7143	53,11847	0,228
			♂	11	344,4545	54,52956	
		CC	♀	7	16,2429	1,83376	0,205
			♂	11	17,9318	3,56001	
		DC	♀	7	10,6657	2,06711	0,057
			♂	10	13,087	2,56759	
		DC/CRC	♀	7	0,0342	0,00252	0,024
			♂	10	0,038	0,00341	
	Total	CRC	♀	42	344,7619	47,50857	0,397
			♂	49	336,3265	46,71875	
		CC	♀	42	19,4374	3,35909	0,368
			♂	48	18,8077	3,23578	
		DC	♀	16	11,3888	2,59726	0,39
			♂	26	12,0942	2,52501	
		DC/CRC	♀	16	0,0354	0,00364	0,276
			♂	26	0,0369	0,00434	
<i>A. munoai</i>		CRC	♀	65	125,8462	8,57181	< 0,001
			♂	90	119,4889	8,23018	
		CC	♀	59	14,2325	1,50492	0,157**
			♂	76	14,5489	1,07595	
<i>A. roberti</i>		CRC	♀	8	204,125	19,13439	0,032
			♂	14	181,8571	23,15452	
		CC	♀	8	16,155	1,78728	0,255
			♂	14	15,3314	1,46289	
		DC	♀	8	5,1813	0,6924	0,971
			♂	11	5,1927	0,66819	
		DC/CRC	♀	8	0,0254	0,0032	0,064
			♂	11	0,028	0,00141	

Tabela 18 – Médias, desvios-padrão (DP) e valores p obtidos em análise de variância, para comparação das medidas de comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento caudal (CC), diâmetro do corpo (DC) e razão entre diâmetro do corpo e comprimento rostro-cloacal de machos e fêmeas. O número amostral (N) de cada grupo também é mostrado.

(continuação)

Espécie	Amostra	Variável	Sexo	N	Média	DP	p
<i>A. trachura</i>	Paraná e Santa Catarina	CRC	♀	5	302,2	25,13364	0,103
			♂	7	262,2857	44,58593	
		CC	♀	5	31,544	4,76854	0,379
			♂	7	28,9214	4,92547	
		DC	♀	5	11,994	1,38175	0,087
			♂	5	10,038	1,76551	
		DC/CRC	♀	5	0,0398	0,00446	0,748
			♂	5	0,0409	0,0064	
	Rio Grande do Sul	CRC	♀	22	259	35,6023	0,077*
			♂	28	241,3929	40,27437	
		CC	♀	16	27,0106	8,37652	0,484**
			♂	25	27,684	4,43921	
		DC	♀	14	9,2571	1,36333	0,534
			♂	17	9,5965	1,59046	
		DC/CRC	♀	14	0,0365	0,0052	0,267
			♂	17	0,0384	0,00386	
	Total	CRC	♀	27	267	37,59501	0,04**
			♂	35	245,5714	41,36159	
		CC	♀	21	28,09	7,81581	0,937**
			♂	32	27,9547	4,49693	
		DC	♀	19	9,9774	1,81653	0,602
			♂	22	9,6968	1,59902	
		DC/CRC	♀	19	0,0374	0,00511	0,303
			♂	22	0,039	0,00451	
<i>A. vermicularis</i>		CRC	♀	14	253	21,958	0,114*
			♂	15	233,7333	50,85619	
		CC	♀	10	26,77	7,88113	0,381
			♂	15	29,972	9,32431	
		DC	♀	14	7,2721	1,42616	0,757*
			♂	15	7,1947	2,12594	
		DC/CRC	♀	14	0,0286	0,0043	0,191
			♂	15	0,0304	0,00298	
			♂	26	0,0371	0,00377	

Tabela 18 – Médias, desvios-padrão (DP) e valores p obtidos em análise de variância, para comparação das medidas de comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento caudal (CC), diâmetro do corpo (DC) e razão entre diâmetro do corpo e comprimento rostro-cloacal de machos e fêmeas. O número amostral (N) de cada grupo também é mostrado.

(conclusão)

Espécie	Amostra	Variável	Sexo	N	Média	DP	p
<i>B. cinereus</i>	CRC		♀	32	174,0313	20,74031	0,995
			♂	28	174	19,04964	
	CC		♀	29	20,9955	3,19445	0,308**
			♂	22	22,115	4,57376	
	DC		♀	31	6,0097	0,9991	0,126
			♂	26	6,39	0,81708	
	DC/CRC		♀	31	0,0349	0,00488	0,07**
			♂	26	0,0371	0,00377	
	CRC		♀	25	144,64	19,74605	0,335*
			♂	20	139,15	20,30887	
<i>T. wiegmanni</i>	CC		♀	25	10,6612	1,31285	0,669
			♂	20	10,8365	1,40764	
	DC		♀	24	7,71	1,88935	0,619**
			♂	19	8,0279	2,27513	
	DC/CRC		♀	24	0,0529	0,00798	0,063*
			♂	19	0,0576	0,00872	

Os valores de p considerados significativos estão destacados.

*Os dados de pelo menos um dos níveis do fator não apresentaram distribuição normal, e por isso foram utilizados para análise os dados submetidos a transformação logarítmica.

** Os dados de pelo menos um dos níveis do fator não apresentaram distribuição normal, mesmo se submetidos a transformação logarítmica.

5 DISCUSSÃO

Os ciclos reprodutivos de machos de Squamata podem ser classificados considerando a época e duração das fases espermatogênica e de estocagem de esperma, bem como a relação temporal dessas fases com o ciclo reprodutivo das fêmeas. Em regiões de clima temperado, os machos apresentam ciclos dos tipos pós-nupcial – no qual a espermiogênese tem lugar após a cópula, na primavera e verão, e os espermatozóides ficam estocados nos ductos deferentes até o início da primavera seguinte – ou misto – quando a espermatogênese se inicia no verão, é interrompida no inverno, e então retomada na primavera (SAINT-GIRONS, 1982; SCHUETT, 1992). Nessas espécies, a fase reprodutiva é geralmente curta e bem sincronizada entre os indivíduos (FITCH, 1970; SAINT-GIRONS, 1982). Em algumas espécies, a espermatogênese pode ocorrer logo antes da época de cópula, caracterizando o chamado ciclo pré-nupcial, e que pode ser observado em espécies de diversas regiões, com exceção daquelas que passam por um período de hibernação (SAINT-GIRONS, 1982). As espécies de regiões tropicais e subtropicais, embora tenham sido até agora muito menos estudadas do que as espécies de latitudes mais altas, parecem tender a exibir fases reprodutivas mais longas em comparação com aquelas de regiões temperadas (FITCH, 1970; LICHT; GORMAN, 1970), e podem mesmo apresentar atividade espermatogênica ao longo de todo o ano (SAINT-GIRONS, 1985). No entanto, mesmo nesse último caso os machos podem exibir fases de maior ou menor recrudescência testicular, caracterizando portanto um tipo de sazonalidade reprodutiva (ZUG; BARBER; DUDLEY, 1982). Embora os ciclos de espécies tropicais e subtropicais sejam muitas vezes classificados como "acíclicos", Mathies (2011) recomenda a supressão desse termo, já que o mesmo sugeriria níveis constantes em todos os processos envolvidos no ciclo reprodutivo de um indivíduo, o que nunca foi observado em nenhum vertebrado.

Mathies (2011) se dedica à discussão de ciclos reprodutivos de serpentes tropicais, e propõe a caracterização dos mesmos levando em conta tanto os ciclos dos indivíduos quanto o observado na população como um todo. Em espécies nas quais o ciclo não é sincronizado entre os indivíduos, ainda que cada macho apresente um ciclo de repouso e atividade reprodutiva, a população poderá ser assazonal, dada a possibilidade de serem encontrados machos com testículos ativos em qualquer época do ano. Assim, a maior ou menor sincronia entre os ciclos reprodutivos dos indivíduos poderá caracterizar uma população como sazonal,

assazonal ou com uma fase reprodutiva mais ou menos extensa. Contudo, espécies assazonais com indivíduos cíclicos não sincrônicos ainda não foram descritas de maneira conclusiva.

Entre as Amphisbaenidae aqui estudadas, foram amostradas três espécies que mostram evidências de ritmicidade reprodutiva dos machos, com fases de atividade e repouso, nos indivíduos. Esses, no entanto, não são sincronizados entre si, de modo que ao longo de todo o ano podem ser amostrados machos com testículos em sua fase ativa. Em *Amphisbaena alba*, *A. roberti* e *A. anomala*, as duas primeiras com ocorrência em áreas de Cerrado e alcançando a Mata Atlântica, e a terceira de região amazônica, foram observados machos espermiogênicos em todos os meses amostrados, e ao mesmo tempo machos não reprodutivos em meses diversos ao longo do ano. Resultado diferente foi obtido para *A. vermicularis*, outra espécie amostrada no Cerrado, da qual todos os machos analisados, com datas de coleta de diferentes meses do ano, estavam espermiogênicos. Assim, não é possível dizer se os machos dessa espécie, assim como as três espécies acima mencionadas, se alternam entre fases ativa e de repouso reprodutivo. No entanto, a não observação de indivíduos em repouso testicular em *A. vermicularis* pode se dever ao tamanho da amostra obtida. A possibilidade de manutenção da atividade espermiogênica em qualquer época do ano sugere, no caso das espécies com distribuição em áreas de Cerrado – nas quais há uma estação seca e uma estação chuvosa bem marcadas –, a não dependência desses ciclos em relação à sazonalidade de precipitação. Por outro lado, as fêmeas de *A. alba* mostraram evidências de um ciclo sazonal, com a fase de ovulação restrita à estação chuvosa. Assim, é possível que o regime de chuvas atue como fator limitante sobre os ciclos das fêmeas.

Saint-Girons (1982) sugere que o único ciclo ambiental determinante para o ciclo reprodutivo dos machos é o de temperatura. Além desse fator ambiental, os ciclos de machos seriam modulados pelos ciclos das fêmeas, esses sim dependentes de outros fatores como a precipitação. De fato, entre as espécies aqui analisadas, apenas as aquelas cujos machos apresentam ciclos espermatogênicos sazonais foram amostradas no sul do Brasil, onde há maior variação sazonal de temperatura. É possível, portanto, que temperaturas mais baixas atuem como um fator limitante em relação a espécies não sazonais. Por outro lado, é importante observar que a queda de temperaturas durante o inverno não interrompe o processo espermatogênico, como observado nos ciclos de tipo misto de espécies de regiões temperadas, em latitudes mais elevadas (SAINT-GIRONS, 1982). Neste estudo, as cinco espécies analisadas com distribuição no sul e sudeste do Brasil apresentaram pelo menos uma parte de sua fase espermiogênica durante o inverno (*A. dubia*, *A. kingi*, *A. munoai*, *A. microcephala* e

A. mertensi). Assim, as temperaturas mais baixas devem interferir em outros aspectos relacionados ao ciclo reprodutivo desses machos, o que ainda não está claro.

Os padrões dos ciclos dos machos parecem, ainda, ter um viés filogenético, uma vez que quase todas as espécies cujos machos têm ciclos sazonais (à exceção de *A. mertensi*) se encontram em um mesmo clado, quando considerada a hipótese filogenética molecular proposta por Mott e Vieites (2009). Aí está também incluída *A. infraorbitale*, a única espécie com ciclo espermatogênico sazonal amostrada em região de cerrado. Ao mesmo tempo, três das quatro espécies assazonais amostradas (*A. alba*, *A. vermicularis* e *A. roberti*) participam de um outro clado, irmão daquele mencionado acima. Já *A. anomala*, também assazonal, se insere na base do grupo que inclui as espécies sazonais. Assim, é possível que os ciclos assazonais de machos tenham evoluído duas vezes entre as Amphisbaenidae do Brasil - uma em *A. anomala*, e outra no ramo que inclui *A. alba*, *A. vermicularis* e *A. roberti*. A sazonalidade reprodutiva, por sua vez, pode ser ancestral para o grupo, uma vez que ocorre em *A. mertensi*, inserida no clado mais basal entre as Amphisbaenidae brasileiras, e também em espécies das famílias Trogonophidae, Blanidae e Bipedidae. *Blanus mettetalii* e *Trogonophis wiegmanni*, das famílias Blanidae e Trogonophidae, respectivamente, foram examinadas neste estudo e por Bons e Saint-Girons (1963), e mostraram uma fase espermiogênica muito curta, limitada a um ou dois meses (maio e junho). Da mesma forma, *Blanus cinereus*, também amostrada no presente estudo, apresenta evidências de atividade reprodutiva entre maio e junho. *Bipes baporus*, *Bipes canaliculatus* e *Bipes tridactylus*, as três espécies representantes da família Bipedidae, também apresentam ciclos sazonais, segundo Papenfuss (1982). A duração da fase espermiogênica nessas três espécies, entretanto, não é conhecida, já que não existem estudos da histologia das vias genitais das mesmas.

Enquanto espécies de Blanidae e Trogonophidae exibem fases espermiogênicas restritas a períodos muito curtos, de um a dois meses, entre as Amphisbaenidae aqui analisadas esse evento do ciclo reprodutivo se estende por períodos mais longos. Em *A. mertensi*, representante do clado mais basal entre as Amphisbaenidae brasileiras, a fase de produção de espermatozóides abrange até seis meses. Entre as demais espécies analisadas, essa fase dura de dois a quatro meses, ou se desenrola ao longo de todo o ano, nas espécies assazonais. Assim, observa-se um aumento na duração da fase reprodutivamente ativa nos representantes brasileiros dessa família. Esse aumento poderia conferir uma maior plasticidade ao controle temporal do ciclo reprodutivo, facilitando a adaptação a diferentes ambientes, em espécies com grandes áreas de distribuição. Entre as *A. mertensi*, foram obtidas evidências de ciclos reprodutivos com características distintas entre os espécimes amostrados

no Cerrado e na Mata Atlântica. Apesar de poucos espécimes do Cerrado terem sido analisados histologicamente, esses se encontravam em fase espermiogênica, em um período no qual todos os machos de localidades de Mata Atlântica estão em repouso reprodutivo. Por outro lado, *A. alba*, espécie amplamente distribuída na maior parte da América do Sul (GANS, 1962) e aqui amostrada de São Paulo a Mato Grosso, em regiões de Cerrado e Mata Atlântica, os dados obtidos não apontaram diferenças no ciclo reprodutivo dos espécimes desses dois biomas.

Acompanhando o aumento da fase espermiogênica, as Amphisbaenidae brasileiras apresentaram também uma fase mais longa de presença de esperma nos ductos deferentes, em comparação com espécies de Blanidae e Trogonophidae. Em *A. dubia*, *A. infraorbitale*, *A. kingi*, *A. microcephala* e *A. munoai*, todas inseridas em um mesmo clado na filogenia proposta por Mott e Vieites (2009), ocorre uma nova característica relacionada à estocagem de esperma nos ductos deferentes. Observou-se que nessas espécies, diferente das demais analisadas, a espermiogênese cessa de um a três meses antes da fase de ovulação das fêmeas, contando os machos então apenas com o esperma estocado naqueles ductos. Uma vez que essa diferença de fase ocorre, em todos os casos, na primavera e por um curto período precedendo a ovulação, é possível que a ocorrência da mesma não se deva a fatores limitantes ambientais, como ocorre nos ciclos pós-nupcial e misto de Squamata de regiões temperadas em relação às temperaturas de inverno (SAINT-GIRONS, 1982; SCHUETT, 1992).

Quanto às fêmeas, todas as espécies aqui amostradas para as quais foi possível estimar a época em que se desenrolam as fases de deposição final de vitelo precedendo a ovulação, e de ovulação propriamente dita, apresentaram evidências de ciclos sazonais. Em todos os casos, o depósito final e mais intenso de vitelo se dá nos dois ou três meses que precedem a ovulação. Essa, por sua vez, ocorre sempre na primavera, ou no início da estação chuvosa. Esse padrão pode estar associado à ocorrência de condições ambientais de temperatura e precipitação mais propícias para a ovipostura e desenvolvimento embrionário. Já a deposição de vitelo não deve ser dependente do aumento das temperaturas ou do volume de chuvas, já que a mesma sempre se inicia na estação seca ou ao final do inverno.

É interessante observar ainda, com relação ao ciclo reprodutivo das fêmeas, que para a maioria das espécies foram observadas indivíduos adultos em vitelogênese primária ou início da vitelogênese secundária nos mesmos meses em que se registraram fêmeas com ovos nos ovidutos. Esse fato foi observado em *A. alba*, *A. dubia*, *A. kingi*, *A. mertensi*, *A. microcephala*, *A. munoai*, *A. trachura* e *T. wiegmanni*, e sugere ciclos com duração superior a um ano para essas espécies – bienais ou mais longos. Apenas em *A. infraorbitale* e *A. roberti*

esse tipo de observação não se repetiu, embora deva ser considerado que os dados de *A. roberti* adultas ainda são escassos. Ciclos reprodutivos com duração superior a um ano também foram sugeridos para fêmeas de *B. cinereus* da região central da Espanha (GIL; GUERRERO; PÉREZ-MELLADO, 1993), *T. wiegmanni* das Ilhas Chafarinas, na costa do Marrocos (MARTÍN et al., 2012), *T. wiegmanni* e *B. mettetali* do Marrocos (BONS; SAINT-GIRONS, 1963), e para as espécies mexicanas *Bipes biporus* e *Bipes canaliculatus* (PAPENFUSS, 1982). Na literatura, o único registro de fêmeas de *Amphisbaenia* reprodutivas anualmente é de *Bipes tridactylus* (PAPENFUSS, 1982). Esse quadro pode refletir um alto investimento reprodutivo por parte dessas fêmeas, embora não tenham sido realizados até o momento, em espécies de *Amphisbaenia*, estudos sobre o custo reprodutivo, tanto em machos quanto em fêmeas.

Entre os machos, por sua vez, a existência de bienalidade reprodutiva poderia ser constatada apenas em espécies sazonais, com indivíduos razoavelmente sincronizados, por meio da observação de machos com testículos em repouso durante a fase específica em que ocorre a espermatogênese. Em espécies assazonais ou com indivíduos assincrônicos torna-se difícil acessar esse aspecto do ciclo, já que se observam machos em sua fase de repouso em diversos meses do ano. Entre as espécies aqui analisadas, apenas para *A. infraorbitale* foram obtidas evidências de um ciclo bienal, dado o registro de alguns machos não reprodutivos durante a época em que a maioria dos indivíduos está em fase espermiogênica. Essa observação pode refletir um custo reprodutivo mais alto para os machos de *A. infraorbitale*, em comparação com as demais espécies de *Amphisbaena*.

Em todas as espécies aqui analisadas, foi observada uma variação morfológica acentuada nos túbulos coletores do néfron, que formam o segmento sexual renal em machos. Nos indivíduos em atividade reprodutiva, esses túbulos se apresentaram hipertrofiados e com suas células repletas de secreção, ao passo que nos machos em repouso reprodutivo esses túbulos apresentaram diâmetros semelhantes aos dos túbulos adjacentes, e não é possível observar os mesmos grânulos de secreção. Entre as espécies sazonais, essa atividade secretora do SSR pode se manter desde o início da espermiogênese até o final da fase de estocagem de esperma nos ductos deferentes (em *A. microcephala*, *A. munoai*, *A. dubia* e *A. infraorbitale*) ou ter início apenas quando passam a ser observados espermatozóides nos ductos deferentes, mantendo-se também durante toda a fase de estocagem (em *A. kingi* e *A. mertensi*). A secreção produzida pelo SSR parece, então, estar associada à manutenção dos espermatozóides nesses ductos. Saint-Girons e Pfeffer (1971) e Aldridge et al. (2011) também sugerem relação entre a estocagem de esperma nos ductos deferentes e a atividade secretora

no SSR. No entanto, as funções da secreção ali produzida ainda não estão claras (ALDRIDGE et al., 2011).

Apesar da variação evidente do SSR sob microscopia de luz, na maioria das espécies esse ciclo não se reflete nas medidas de comprimento e diâmetro dos rins. Em *A. kingi* e *A. microcephala*, foi observada uma variação nessas medidas ao longo do ano, mas essa não foi significativa. Já *A. alba* e *A. anomala*, duas espécies com espermatogênese assazonal, foi observada variação significativa no comprimento e no diâmetro do rim, respectivamente. Essa variação sugere a ocorrência de sazonalidade em algum aspecto do ciclo reprodutivo e pode ser indicativa da época de cópula, uma vez que a diferenciação e hipertrofia dessa região está ligada ao nível de hormônios androgênicos no plasma (FOX, 1977). A hipertrofia do segmento sexual renal também foi observada em machos espermiogênicos de *B. cinereus* e *T. wiegmanni* por Bons e Saint-Girons (1963), e em *A. alba*, *A. vermicularis* e *A. polystega* por Valverde, Scherer e Pinheiro (2005).

Já as medidas de volume testicular refletem, com pequenas diferenças de fase, a ocorrência de atividade espermatogênica nas espécies sazonais. No entanto, o aumento ou queda nesses volumes acontecem normalmente um mês antes ou depois dos limites da fase espermiogênica, de modo que para a correta determinação da fase ativa dos testículos, a análise histológica desses órgãos é indispensável. A correspondência entre a fase espermatogênica e o aumento dos volumes testiculares também foi observada em *Vipera berus* (VOLSØE, 1944). Mathies (2011), no entanto, enfatiza que essa relação nem sempre se dá de maneira evidente em serpentes neotropicais, motivo pelo qual o ciclo de algumas espécies pode ser interpretado erroneamente como sazonal se for considerado apenas o volume testicular, sem se observar a histologia desses órgãos. O aspecto convoluto dos ductos deferentes, por sua vez, parece ser um bom indicativo da fase de estocagem de esperma nos machos. No entanto, foram observados dois indivíduos de *A. dubia* e *A. microcephala* em que os ductos assumiram esse aspecto pouco antes da fase de estocagem. Portanto, a identificação precisa desse evento do ciclo reprodutivo também depende essencialmente de análises histológicas.

Quanto à histologia dos ovidutos, as espécies analisadas apresentaram características semelhantes. Todas exibem a estrutura básica observada em répteis, com endométrio formado por epitélio simples e lâmina basal conjuntiva, seguido então do miométrio e de uma camada serosa (GIRLING, 2002). Na fase reprodutiva, o epitélio do oviduto posterior pode se apresentar colunar e com dobras, ao passo que o oviduto médio passa a exibir glândulas em toda a espessura da lâmina basal. Essas glândulas tornam-se ativas nas fêmeas próximas à

ovulação, e assim se mantém naquelas com ovos nos ovidutos. Presentes também nos demais Squamata, sua secreção está ligada à produção da casca dos ovos, nas espécies ovíparas (GIRLING, 2002). Mais cranialmente, na região posterior do infundíbulo, já havia sido observada em todos os grupos de répteis, com exceção de Amphisbaenia, a ocorrência de pequenas estruturas semelhantes a glândulas, com ductos ciliados, que funcionam como receptáculos de esperma (FOX, 1977; SAINT-GIRONS, 1985; BLACKBURN 1998; GIRLING, 2002; SIEGEL et al., 2011). No presente estudo, foram identificadas pela primeira vez essas estruturas em Amphisbaenia, em cortes histológicos de infundíbulos de *A. infraorbitale*, *A. microcephala* e *A. trachura*, embora não tenham sido observados espermatozóides em seu interior. Tais receptáculos só foram observados nas fêmeas com os maiores folículos secundários amostrados na espécie, provavelmente próximas à ovulação, e nas fêmeas que apresentavam ovos nos ovidutos. Visto que, nessas três espécies, os machos ainda apresentam espermatozóides em seus ductos deferentes durante a fase de ovulação das fêmeas, esses receptáculos não devem ter função de estocagem por longo período, mas é possível que aumente a eficiência da fecundação ao manter espermatozóides até o momento exato da ovulação. Em serpentes, segundo Blackburn (1998), a estocagem nesses receptáculos pode ter duração de horas a anos.

Quanto ao dimorfismo sexual, observou-se que na maioria das espécies analisadas machos e fêmeas não diferem quanto ao comprimento rostro-cloacal, comprimento caudal e diâmetro do corpo. Apenas *A. anomala* e *A. infraorbitale* apresentaram dimorfismo sexual quanto ao comprimento da cauda, sendo as médias amostradas para machos maiores do que as das fêmeas. Essa diferença pode estar relacionada à acomodação dos hemipênis e seus músculos retratores no interior da cauda, como também observado por Bonnet et al. (1998) em serpentes. Já o CRC é maior em fêmeas de *A. kingi*, *A. munoai*, *A. trachura*, *A. roberti*, e *A. mertensi*. Essa diferença também foi observada por Vega (2001) em *A. kingi* da Argentina. O maior CRC em fêmeas pode ser resultado de seleção ligada à maior fecundidade de fêmeas com maiores cavidades abdominais (SHINE, 1992; SHINE, 1994). Por outro lado, apesar de as fêmeas de *A. munoai* apresentarem maiores medidas de CRC em relação os machos, não se observou relação significativa entre essa medida e o número ou volume dos ovos por fêmea. Essa observação coloca em dúvida a possibilidade de que o dimorfismo sexual nessa espécie esteja relacionado à fecundidade das fêmeas.

Em *A. infraorbitale* também se observou dimorfismo sexual de CRC mas, diferente das demais espécies, nesse caso os machos apresentaram-se maiores do que as fêmeas. Bonnet et al. (1998) e Shine (1994) sugerem que maiores tamanhos corporais em machos podem ser

selecionados em espécies nas quais ocorre comportamento de combate. Não há registro na literatura de combates entre machos de *Amphisbaenia*, mas é interessante observar que os machos de *A. infraorbitale* apresentam ciclo reprodutivo bienal, o que poderia estar ligado a um mais alto custo reprodutivo devido a combates.

Em nenhuma espécie foi observado dimorfismo sexual quanto ao diâmetro do corpo ou à razão entre essa medida e o comprimento rostro-cloacal. Logo, o diâmetro do corpo pode não ser objeto de seleção com relação ao aumento da fecundidade em *Amphisbaenidae*, como observado em alguns lagartos e serpentes (SHINE, 1992; BONNET et al., 1998), o que pode estar relacionado às limitações impostas pelo hábito de vida subterrâneo. Martín et al. (2012) também discutem que as especializações para a escavação de *Amphisbaenia* podem restringir a evolução de dimorfismo sexual. Aqueles autores não observaram diferença de CRC entre machos e fêmeas de *T. wiegmanni*, embora entre machos e fêmeas de mesmo comprimento, os machos apresentem maiores caudas e cabeças mais largas. Em *Blanus cinereus* do centro da Espanha, Gil, Guerrero e Pérez-Mellado (1993) também não observaram diferenças entre machos e fêmeas quanto às medidas de comprimento, largura e altura da cabeça, CRC e CC.

A disposição dos ovos em fila na cavidade abdominal da maioria das fêmeas de *Amphisbaenia* amostradas pode estar relacionada à não observação de dimorfismo sexual de diâmetro do corpo nessas espécies, e também pode ser importante para o hábito subterrâneo das mesmas, na medida em que promove distensão mínima no diâmetro do corpo das fêmeas. No presente estudo, foram observadas fêmeas de nove espécies com ovos ou embriões nos ovidutos. Dentre essas, oito espécies (*A. alba*, *A. dubia*, *A. infraorbitale*, *A. kingi*, *A. microcephala*, *A. munoai*, *A. roberti* e *T. wiegmanni*) sempre apresentaram seus ovos dispostos em fila. A única exceção foi *A. trachura*, que tinha os ovos dos ovidutos esquerdo e direito dispostos lado a lado. Também em *A. trachura* foi registrado o maior número de ovos nos ovidutos de uma fêmea (nove). É possível, portanto, que os ovos dessa espécie apresentem um menor tamanho relativo considerando o volume da cavidade abdominal da mãe. Assim, seria interessante realizar uma análise mais detalhada acerca do tamanho relativo dos ovos dessa espécie, amostrando-se mais espécimes e comparando esses dados com outras espécies do grupo.

Considerando os dados disponíveis na literatura, o número de ovos observado nos ovidutos dessa fêmea da *A. trachura* é, também, o maior registrado em fêmeas de *Amphisbaenia*. Os maiores tamanhos de ninhada registrados até então haviam sido de oito ovos, observados em *A. alba* (BARROS-FILHO; NASCIMENTO, 2003) e *A. mertensi* (ANDRADE et al., 2006). No presente estudo, o número máximo de ovos observado em *A.*

mertensi (sete) também foi alto em comparação com as demais espécies amostradas, que apresentaram no máximo cinco ovos. Andrade et al. (2006) observaram, em sua revisão de dados acerca da biologia reprodutiva de *Amphisbaenia*, que o tamanho da ninhada de espécies do grupo está geralmente entre 2 e 6 ovos. Os mesmos autores fornecem ainda dados indicativos de altos valores de massa relativa da ninhada (dado pela razão entre a massa dos ovos e a massa da mãe) em *A. roberti* e *A. mertensi*. Martín et al. (2011b), ao observar em *T. wiegmanni* das Ilhas Chafarinas ninhadas de apenas um filhote e uma baixa frequência reprodutiva nas fêmeas, sugerem que essa espécie seja uma estrategista k, o que poderia estar relacionado a limitações energéticas ligadas ao hábito subterrâneo. Os mesmos autores ainda sugerem que o pequeno tamanho de ninhada pode ser compensado por cuidado parental, mencionando o fato de jovens de *T. wiegmanni* serem frequentemente encontrados junto a adultos, segundo dados de Martín et al. (2011).

6 CONCLUSÕES

- Os ciclos reprodutivos de fêmeas de sete espécies de Amphisbaenidae do Brasil pôde ser caracterizado como sazonal, sendo que seis apresentam evidências de ciclos ao menos bienais (*Amphisbaena alba*, *A. dubia*, *A. kingi*, *A. mertensi*, *A. microcephala* e *A. munoai*) e uma tem ciclo anual (*A. infraorbitale*);
- Os machos de *A. alba*, *A. roberti*, *A. anomala* e *A. vermicularis* têm ciclos assazonais, sendo que as três primeiras apresentam fases de atividade e repouso reprodutivo, que no entanto não são sincronizadas entre os indivíduos;
- Os machos de *A. dubia*, *A. infraorbitale*, *A. kingi*, *A. mertensi*, *A. microcephala*, *A. munoai*, *A. trachura*, *Blanus cinereus*, *B. mettetalis* e *Trogonophis wiegmanni* têm ciclos sazonais, e diferem entre si quanto à duração e época das fases de espermatogênese, estocagem de esperma e hipertrofia do segmento sexual renal;
- As espécies brasileiras de Amphisbaenidae têm fases reprodutivas mais longas em relação às espécies representantes das famílias Blanidae e Trogonophidae, *Blanus cinereus*, *B. mettetalis* e *Trogonophis wiegmanni*;
- Em *A. dubia*, *A. infraorbitale*, *A. kingi*, *A. microcephala* e *A. munoai* a fase espermiogênica cessa antes da fase de ovulação das fêmeas, e no intervalo entre esses dois eventos, espermatozóides são mantidos estocados nos ductos deferentes;
- O segmento sexual renal de todas as espécies amostradas se mantém secretor enquanto há estocagem de esperma nos ductos deferentes;
- A espermatogênese não é interrompida ou limitada por baixas temperaturas no inverno, nas espécies do sul do Brasil, ou pela baixa pluviosidade, em espécies que ocorrem em áreas de Cerrado;

- Os ciclos reprodutivos de fêmeas de *A. alba*, *A. dubia*, *A. infraorbitale*, *A. kingi*, *A. microcephala*, *A. munoai* e *T. wiegmanni* são sazonais e, à exceção e *A. infraorbitale*, apresentam evidências de bienalidade ou ciclos mais longos;
- As fêmeas de *A. alba*, *A. dubia*, *A. kingi*, *A. mertensi*, *A. microcephala*, *A. munoai*, *A. trachura* e *T. wiegmanni* apresentam ciclos bienais ou mais longos, ao passo que as fêmeas de *A. infraorbitale* parecem se reproduzir anualmente;
- Os ovidutos das fêmeas de todas as espécies amostradas apresentam estrutura básica semelhante, com glândulas uterinas que entram em fase secretora próximo à ovulação;
- As fêmeas de *A. trachura*, *A. infraorbitale* e *A. microcephala* apresentam receptáculos de esperma com ductos ciliados na região posterior do infundíbulo;
- Foram obtidas evidências preliminares de relação entre a sazonalidade do ciclo reprodutivo de machos e as variações anuais de temperatura;
- As características de sazonalidade e duração das fases do ciclo reprodutivo de machos parecem ter relação com a filogenia de Amphisbaenidae;
- As fêmeas de *A. kingi*, *A. munoai*, *A. trachura*, *A. roberti*, e *A. mertensi* têm comprimento rostro-cloacal maior do que os machos, e os machos de *A. infraorbitale* têm essa medida maior do que as fêmeas;
- os machos de *A. anomala* e *A. infraorbitale* têm o comprimento da cauda maior do que o das fêmeas;
- A fecundidade de fêmeas das espécies analisadas varia entre 1 e 9 ovos por fêmea e, com exceção de *A. trachura*, se dispõem em linha na cavidade abdominal.

REFERÊNCIAS

- AB'SÁBER, A. Domínios morfoclimáticos e províncias fitogeográficas do Brasil. **Revista Orientação**, Instituto de Geografia da Universidade de São Paulo (IGEOG/USP), n. 3, p. 45-48, 1967.
- AB'SÁBER, A. **Os domínios de natureza no Brasil**: potencialidades paisagísticas. 4ª edição. São Paulo: Ateliê Editorial, 2007. 160 p.
- AB'SÁBER, A. O domínio morfoclimático amazônico. **Geomorfologia**, n. 1, p. 1-12, 1966.
- 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**. Enfield: CRC Press, 2011. p. 477-509.
- 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, p. 109-112, 2002.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; LAPORTA-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 and Physiology**, v. 139, p. 169-174, 2004.
- ANDRADE, D. V.; NASCIMENTO, L. B., ABE, A. S. Habits hidden underground: a review on the reproduction of the Amphisbaenia with notes on four neotropical species. **Amphibia-Reptilia**, v. 27, p. 207-217, 2006.
- BALESTRIN, R. L.; CAPPELLARI, L. H. Reproduction and feeding ecology of *Amphisbaena munoai* and *Anops kingi* (Amphisbaenia, Amphisbaenidae) in the *Escudo Sul-Rio-Grandense*, southern Brazil. **Iheringia**, v. 101, n. 1-2, p. 93-102, 2011. Série zoologia.
- BARROS-FILHO, J. D.; NASCIMENTO, L. B. *Amphisbaena alba* (white-bellied worm-lizard). Reproduction. **Herpetological Review**, v. 34, n. 3, p. 243-244, 2003.
- BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. (org.). **Répteis brasileiros**: lista de espécies. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Versão 2012.2, 2012. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Acesso em 27 de janeiro de 2013.
- BLACKBURN, D. G. Structure, function and evolution of the oviducts of Squamate reptiles, with special reference to viviparity and placentation. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 282, p. 560-617, 1998.

BONNET, X.; SHINE, R.; NAULLEAU, G.; VACHER-VALLAS, M. Sexual dimorphism in snakes: different reproductive roles favour different body plans. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 265, p. 179-183, 1998.

BONS, J.; SAINT-GIRONS, H. Ecologie et cycle sexuel des Amphisbénien du Maroc. **Bulletin de la Société des Sciences Naturelles et Physiques du Maroc**, v. 43, 3^o trimestre, p. 117-168, 1963.

BROADLEY, D. G.; GANS, C.; VISSER, J. Studies on amphisbaenians (Amphisbaenia, Reptilia): 6. The genera *Monopeltis* and *Dalophia* in southern Africa. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v.157, n. 5, p. 311-486, 1976.

CARR, A. Notes on eggs and young of the lizard *Rhineura floridana*. **Copeia**, n. 1, p. 77, 1949.

COLLI, G. R.; ZAMBONI, D. S. Ecology of the worm lizard *Amphisbaena alba* in the cerrado of central Brazil. **Copeia**, n. 3, p. 733-742, 1999.

CONRAD, J. L. Phylogeny and systematics of Squamata (Reptilia) based on morphology. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, n. 310, p. 1-182, 2008.

FITCH, H. S. Reproductive cycles in lizards and snakes. **University of Kansas, Museum of Natural History Miscellaneous Publications**, n. 52, p. 1-247, 1970.

FOX, H. The urogenital system of Reptiles. In: GANS, C. **Biology of the Reptilia**. London: Academic Press, 1977. p. 1-122. v.6.

GANS, C. Checklist and bibliography of the Amphisbaenia of the world. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, n. 289, p. 1-130, 2005.

GANS, C. Notes on amphisbaenids (Amphisbaenia, Reptilia). 5. A redefinition and a bibliography of *Amphisbaena alba* Linné. **American Museum Novitates**, n. 2105, p. 1-31, 1962.

GANS, C.; ALEXANDER, A. A. Studies on amphisbaenids (Amphisbaenia, Reptilia) 2. On the amphisbaenids of the Antilles. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, v. 128, n. 3, p. 65-158, 1962.

GANS, C. Studies on amphisbaenians (Amphisbaenia, Reptilia): 4. A review of the amphisbaenid genus *Leposternon*. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, New York, v. 144, p. 379-464, 1971.

GANS, C.; KRAKLAU, D. M. Studies on Amphisbaenians (Reptilia). 8. Two genera of small species from East Africa (*Geocalamus* and *Loveridgea*). **American Museum Novitates**, v. 2944, p. 1-28, 1989.

GIL, M. J.; GUERRERO, F.; PÉREZ-MELLADO, V. Observations on morphometrics and ecology in *Blanus cinereus* (Reptilia: Amphisbaenia). **Journal of Herpetology**, Salt Lake City, v. 27, p. 205-209, 1993.

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.

GOELDI, E. A. Die eier von 13 brasilianischen Reptilien, nebst Bemerkungen über Lebens – und Fortpflanzungsweise letzterer. Beobachtungen aus den Jahren 1884-1897. **Zoologische Jahrbucher Abteilung fuer Systematik, Oekologie und Geographie der Tiere**, v. 10, p. 640-676, 1898.

GORZULA, S.; SALAZAR, C.; RENDON, D. Aspects of the ecology of *Amphisbaena alba* Linnaeus in the venezuelan Guayana. **British Journal of Herpetology**, v. 5, p. 623-626, 1976.

HIJMANS, R. J.; CAMERON, S. E.; PARRA, J. L.; JONES, P. G.; JARVIS, A. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. **International Journal of Climatology**, n. 25, p. 1965-1978, 2005.

HOOGMOED, M. S.; PINTO, R. R.; ROCHA, W. A.; PEREIRA, E. G. A new species of *Mesobaena* Mertens, 1925 (Squamata: Amphisbaenidae) from Brazilian Guiana, with a key to the Amphisbaenidae of the guianan region. **Herpetologica**, v. 65, n. 4, p. 436-448, 2009.

JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Natural history notes. *Leposternon infraorbitale* (two-headed snake). Reproduction. **Herpetological Review**, v. 28, n. 1, p. 44-45, 1997.

KEARNEY, M. Systematics of the Amphisbaenia based on morphological evidence from recent and fossil forms. **Herpetological monographs**, v. 17, p. 1-74, 2003.

KEARNEY, M.; STUART, B. L. Repeated evolution of limblessness and digging heads in worm lizards revealed by DNA from old bones. **Proceedings of the Royal Society of London**, 2004 B, p. 1677-1683, 2004.

LICHT, P.; GORMAN, G. C. Reproductive and fat cycles in caribbean anolis lizards. **University of California Publications in Zoology**, v. 95, p. 1-52, 1970.

MACEY, J. R.; PAPENFUSS, T. J.; KUEHL, J. V.; FOURCADE, H. M.; BOORE, J. L. Phylogenetic relationships among amphisbaenian reptiles based on complete mitochondrial genomic sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 33, p. 22-31, 2004.

MARTÍN, J.; POLO-CAVIA, N.; GONZALO, A.; LÓPEZ, P.; CIVANTOS, E. Sexual dimorphism in the north African amphisbaenian *Trogonophis wiegmanni*. **Journal of Herpetology**, v. 46, n. 3, p. 338-341, 2012.

MARTÍN, J.; POLO-CAVIA, N.; GONZALO, A.; LÓPES, P.; CIVANTOS, E. Social aggregation behavior in the North African amphisbaenian *Trogonophis wiegmanni*. **African Journal of Herpetology**, v. 60, n. 2, p. 171-176, 2011.

MARTÍN, J.; POLO-CAVIA, N.; GONZALO, A.; LÓPES, P.; CIVANTOS, E. Structure of a population of the amphisbaenian *Trogonophis wiegmanni* in north Africa. **Herpetologica**, v. 67, n. 3, p. 250-257, 2011b.

MATHIES, T. Reproductive cycles of tropical snakes. In: ALDRIDGE, R.D.; SEVER, D.M. **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Enfield: CRC Press, 2011. p. 511-550.

MOTT, T; VIEITES, D. R. Molecular phylogenetics reveals extreme morphological homoplasy in Brazilian worm lizards challenging current taxonomy. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, p. 190 – 200, 2009.

NIMER, E. Um modelo metodológico da classificação de climas. **Revista Brasileira de Geografia**, v. 41, n. 4, p. 59-89, 1979.

OLSON, D. M.; DINERSTEIN, E.; WIKRAMANAYAKE, E. D.; BURGESS, N. D.; POWELL, G. V. N.; UNDERWOOD, E. C.; D'AMICO, J. A.; ITOUA, I.; STRAND, H. E.; MORRISON, J. C.; LOUCKS, C. J.; ALLNUTT, T. F.; RICKETTS, T. H.; KURA, Y.; LAMOREUX, J. F.; WETTENGEL, W. W.; HEDAO, P.; KASSEM, K. R. Terrestrial ecoregions of the world: a new map of life on earth. **BioScience**, v. 51, n. 11, p. 933-938, 2001.

PAPENFUSS, T. J. The ecology and systematics of the Amphisbaenian genus *Bipes*. **Occasional Papers of the California Academy of Sciences**, San Francisco, n. 136, p. 1-42, 1982.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; McMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and earth system sciences*, v. 11, p. 1633-1644, 2007.

PEREZ, R.; RIBEIRO, S.; BORGES-MARTINS, M. Reappraisal of the Taxonomic status of *Amphisbaena prunicolor* (Cope 1885) and *Amphisbaena albocingulata* Boettger 1885 (Amphisbaenia: Amphisbaenidae). **Zootaxa**, n. 3550, p. 1-25, 2012.

PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; MARQUES, O. A. V. Biologia reprodutiva de serpentes brasileiras. In: NASCIMENTO, L. B.; OLIVEIRA, M. E. **Herpetologia no Brasil II**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2007. p. 201-221.

SAINT-GIRONS, H. Comparative data on Lepidosaurian reproduction and some time tables. In: GANS, C.; BILLET, F. **Biology of the Reptilia**. New York: John Wiley & Sons, 1985. p. 35-58. v. 15.

SAINT-GIRONS, H.; PFEFFER, P. Le cycle sexuel des serpents du Cambodge. **Annales des sciences naturelles**, v. 13, p. 543-572, 1971. 12e série, zoologie.

SAINT-GIRONS, H. Morphologie comparée du segment sexual du rein des Squamates. **Archives d'anatomie comparée e de morphologie experimentale**, v. 61, n. 6, 1972.

SAINT-GIRONS, H. Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycles. **Herpetologica**, v. 38, n. 1, p. 5-16, 1982.

SANTOS, L. C. **Biologia reprodutiva de Leposternon microcephalum (Squamata, Amphisbaenidae) do sudeste do Brasil**. 2009. 134 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SCHUETT, G. Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers? In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE, E. D. **Biology of Pitvipers**. Tyler, Texas: Selva, 1992. p. 169-184.

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.

SHINE, R. Relative clutch mass and body shape in lizards and snakes: is reproductive investment constrained or optimized? **Evolution**, v. 46, n. 3, p. 828-833, 1992.

SHINE, R. Sexual size dimorphism in snakes revisited. **Copeia**, n. 2, p. 326-346, 1994.

TOWNSEND, T. M.; LARSON, A.; LOUIS, E.; MACEY, J. R. Molecular phylogenetics of Squamata: The Position of Snakes, Amphisbaenians, and Dibamids, and the Root of the Squamate Tree. **Systematic Biology**, v. 53, n. 5, p. 735-757, 2004.

VALVERDE, M. C. C.; SCHERER, P. O.; PINHEIRO, N. L. Características histológicas do segmento sexual do rim de três espécies de Amphisbaenia (Reptilia: Squamata). **Sitientibus**, v. 5, n. 1, p. 3-8, 2005. Série Ciências Biológicas.

VEGA, L. Reproductive and feeding ecology of the Amphisbaenian *Anops kingi* in east-central Argentina. **Amphibia-Reptilia**, v. 22, p. 447-454, 2001.

VIDAL, N.; AZVOLINSKY, A.; CRUAUD, C.; HEDGES, S. B. Origin of tropical American burrowing reptiles by transatlantic rafting. **Biology Letters**, v. 4, n. 1, p. 1-4. Disponível em: <http://journals.royalsociety.org>. Acesso em: 2007.

VISSER, J. First report of ovoviviparity in a southern African amphisbaenid, *Monopeltis capensis*. **Zoologica Africana**, v. 3, n. 1, p. 111-113, 1967.

VOLSØE, H. Structure and seasonal variation of the male reproductive organs of *Vipera berus* (L.). **Spolia Zoologica Musei Hauniensis**, v. 5, p. 1-172, 1944.

ZUG, G. R.; MARGARET, M.B.; DUDLEY, J.C. Gonadal histology and reproduction in *Carlia bicarinata* (Scincidae, Sauria, Reptilia) of the port Moresby area, Papua New Guinea, **Herpetologica**, v. 38, n. 3, p. 418-425, 1982.