CAIO HENRIQUE DE OLIVEIRA CARNIATTO

**Obtenção das células indiferenciadas do saco vitelino de *Crotalus durissus*
(Linnaeus, 1758) (Ophidia: Viperidae)**

São Paulo
2015

CAIO HENRIQUE DE OLIVEIRA CARNIATTO

**Obtenção das células indiferenciadas do saco vitelino de *Crotalus durissus*
(Linnaeus, 1758) (Ophidia: Viperidae)**

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Mariana Matera Veras

São Paulo

2015

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3080
FMVZ

Carniatto, Caio Henrique de Oliveira

Obtenção das células indiferenciadas do saco vitelino de *Crotalus durissus*
(Linnaeus, 1758) (Ophidia: Viperidae) / Caio Henrique de Oliveira Carniatto. --
2015.
57 f.

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

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

Orientador: Profa. Dra. Mariana Matera Veras.

1. Cascavel. 2. *Crotalus*. 3. Placenta. 4. Placentação. 5. Serpente. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Obtenção das células indiferenciadas do saco vitelino de *Crotalus durissus* (Linnaeus, 1758) (Ophidia: Viperidae)", protocolado sob o nº 2944/2013, utilizando 5 (cinco) serpentes, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Rosângela Felipe Rodrigues, foi aprovado em reunião de 16/10/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Achievement of stem cells from the yolk sac of *Crotalus durissus* (Linnaeus, 1758) (Ophidia: Viperidae)", protocol number 2944/2013, utilizing 5 (five) snakes, under the responsibility Profa. Dra. Rosângela Felipe Rodrigues, was approved in the meeting of day 16/10/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 17 de março de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CARNIATTO, Caio Henrique de Oliveira

Título: **Obtenção das células indiferenciadas do saco vitelino de *Crotalus durissus* (Linnaeus, 1758) (Ophidia: Viperidae)**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, **Maria Terezinha**, por estar sempre presente na minha vida, em todos os momentos. Obrigado por ser meu apoio constante e incondicional, e ser sempre meu amparo. Todas as vitórias da minha vida são dedicadas a você!

Dedico este trabalho, também, à **Lilá** e ao **Bronx** (*in memoriam*); sem vocês eu não teria entusiasmo pra ter chego até aqui!

AGRADECIMENTOS

Sou sempre grato a **Deus**, por me dar todas as condições de ter desenvolvido este trabalho. Tenho certeza que com fé, determinação e coragem, a gente chega a qualquer lugar.

Agradeço meu pai, **Laércio**, pelo “apoio logístico”, tão necessário no mestrado; a minha irmã **Emmanuelle**, agradeço por ter me auxiliado, e muito, nas mais diversas atividades, e por me ajudar prontamente, aliviando as dores de cabeça que eventualmente surgiram. Sem vocês, certamente, eu não teria concluído mais essa etapa. Amo vocês!

À Profa. Dra. **Maria Angelica Miglino**, pela oportunidade de desenvolver o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

À Dra. **Rosangela Felipe Rodrigues**, minha “orientadora do primeiro tempo”, agradeço pelo amparo inicial, e principalmente por ter acreditado em mim. Sempre vou me lembrar do dia em que nos conhecemos, e de como você foi gentil e prestativa comigo. Obrigado!

À Dra. **Mariana Matera Veras**, minha “orientadora do segundo tempo”, agradeço por ter ajudado imensamente neste estudo. Muito obrigado pela ajuda na confecção e leitura das lâminas histológicas, e na dissecação dos fetos. Obrigado por me receber no seu laboratório e me ensinar que, de um jeito ou de outro, no final tudo dá certo. Obrigado!

À Dra. **Rose Eli Grassi Ricci**, agradeço pelas conversas francas, e por ser sempre um ombro amigo durante a pós-graduação. Torço muito por você, obrigado!

À Dra. **Selma Maria Almeida-Santos**, e ao doutorando **Igor Stefan Popovic Federsoni**, obrigado por terem me cedido a serpente utilizada neste estudo, e pelas conversas produtivas sobre a reprodução das serpentes. Obrigado!

Ao Instituto Butantan, em especial ao Dr. **Durvanei Augusto Maria**, e ao pessoal do seu laboratório, por terem me recebido tão gentilmente. Manu, obrigado por ter me ajudado no congelamento e processamento das células! Obrigado!

Ao meu amigo, biólogo e herpetólogo, **Ricardo Lourenço-de-Moraes**, agradeço imensamente por ter me apresentado à herpetologia. Obrigado!

Aos funcionários do Setor de Anatomia, em especial aos queridos **Jaqueline** e **Maicon**, e ao Dr. **André Franciulli**. Vocês são a prova de que a simpatia faz toda a diferença. Obrigado!

Aos funcionários da biblioteca Virgínia Buff D'Apice, em especial às senhoras **Neusa Habe** e **Elza Faquim**, agradeço pelas correções da dissertação, e pela simpatia sempre presente. Obrigado!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pelo financiamento desta pesquisa.

A minha amiga paulistana **Juliana Catoia**. Obrigado por estar presente nos momentos de tensão, nos momentos de alegria, nos momentos de desespero (esses foram tantos...), nos momentos de diversão (Diana!!!). Obrigado e muito, obrigado sempre!

Aos amigos da pós-graduação: **Carol**, obrigado pela amizade, nos divertimos e choramos muito juntos, mas no final tudo valeu a pena. **Jéssica** e **Lara**, impossível, não me lembrar de vocês! Foram tantos momentos, tantas risadas, tantas confidências. Obrigado por tornarem o mestrado muito mais divertido! **Miguel** e **Rennan**, obrigado pelas risadas! **Phelipe**, obrigado por me ajudar nas pranchas da cuíca. Ps.: Sei que ainda estou te devendo um tigre! **Joseleide** e **Ana Paula**, minhas amigas do doutorado, que eu sempre vou lembrar com muito carinho. Josy, obrigado pelas dicas sobre concursos; Ana, obrigado pelo suporte epidemiológico nos artigos que nós, com certeza, vamos publicar em 2015! Meu amigo **Márcio**, obrigado por me atender sempre que tive dúvidas relacionadas à veterinária! **Dr. César Prado (Mister César)**, agradeço pelas divertidas conversas no WhatsApp, geralmente em momentos extremamente tensos. A “Saga Cuíca” sempre será lembrada! **Fernanda Menezes**, amiga do Biriba, obrigado pelas conversas sinceras! **Marina**, obrigado pelas infinitas risadas, seja fazendo compras para a sua festa, seja no skype, seja pessoalmente. As fotos no WhatsApp sempre serão lembradas!

RESUMO

CARNIATTO, C. H. O. **Obtenção das células indiferenciadas do saco vitelino de *Crotalus durissus* (Linnaeus, 1758) (Ophidia: Viperidae)**. [Anchievement of stem cell from the yolk sac of *Crotalus durissus* (Linnaeus, 1758) (Ophidia: Viperidae)]. 2015. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A serpente *Crotalus durissus*, popularmente conhecida como cascavel, pertence à família Viperidae, e como a maioria dos viperídeos, é uma espécie vivípara. Este estudo teve como objetivo descrever a histologia do oviduto de fêmeas adultas e do saco vitelino e cordão umbilical de fetos em estágios gestacionais avançados de *Crotalus durissus*. A placenta de *Crotalus durissus* é constituída pela aposição do epitélio de revestimento do oviduto com a membrana corio-alantoidina que recobre o hemisfério embrionário do “ovo”. Estas se interdigitam sutilmente e separando a membrana corio-alantoidinana e o revestimento do oviduto está um remanescente da casca do ovo, chamada de membrana da casca. Quando avaliada a distribuição das fibras do sistema colágeno na placenta corio-alantoidina observamos que as fibras se distribuem irregularmente formando arcabouços de sustentação para os vasos e conferindo maior resistência nas regiões próximas a superfície logo abaixo do epitélio coriônico. Em estágios avançados de gestação, a parede do oviduto de *Crotalus durissus* apresenta-se como uma estrutura delgada, composta por um epitélio com células cuboidais, repousando em uma lâmina própria constituída por tecido conjuntivo. A mucosa do oviduto de *Crotalus durissus* apresenta regiões com projeções semelhantes à vilos, sustentados por eixos de fibras colágenas. Em estágios avançados de gestação, a face voltada para o feto do saco vitelino está revestida por um epitélio de células colunares grandes com núcleo posicionado basalmente, apresentando grânulos eosinófilicos. O conteúdo vitelino é, basicamente, constituído por depósitos celulares ricos em proteína e muito eosinófilicos. A distribuição do vitelo parece apresentar uma organização em forma de “cachos de uvas” sendo os ramos constituídos por trabéculas de células que trazem consigo vasos sanguíneos. Em *Crotalus durissus*, o cordão umbilical promove a conexão entre os tecidos maternos e os fetos, sendo uma estrutura ricamente vascularizada, constituído por duas artérias e uma veia e o ducto alantoide, envoltos por um tecido mucoide (mesenquimal).

Palavras-chave: Cascavel. *Crotalus*. Placenta. Placentação. Serpente.

ABSTRACT

CARNIATTO, C. H. O. **Anchorage of stem cells from the yolk sac of *Crotalus durissus* (Linnaeus, 1758) (Ophidia: Viperidae)**. [Obtenção das células indiferenciadas do saco vitelino de *Crotalus durissus* (Linnaeus, 1758) (Ophidia: Viperidae)]. 2015. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The snake *Crotalus durissus*, popularly known as rattlesnake, belongs to the family Viperidae, and like most viperids, is a viviparous species. This study aimed to describe the oviduct histology of adult females and yolk sac and umbilical cord of fetuses in advanced stages of pregnancy in *Crotalus durissus*. The *Crotalus durissus* placenta is formed by affixing the oviduct epithelium lining with chorio-alantoidina membrane covering the embryonic hemisphere of the "egg". These interdigitate subtly and separating the chorio-alantoidina membrane and the oviduct of the coating is one of the eggshell remnant, called the shell membrane. When evaluated the distribution of collagen fibers in the system chorio-alantoidina placenta observed that the fibers forming irregularly distributed support frameworks for vessels and providing greater resistance in the regions near the surface just below the chorionic epithelium. In advanced stages of pregnancy, the wall of the oviduct in *Crotalus durissus* appears as a thin structure made up of a cuboidal epithelium with cells, resting on a lamina consists of connective tissue. The mucosa of the oviduct of *Crotalus durissus* presents regions with projections similar to the villi, supported by shafts of collagen fibers. In advanced stages of pregnancy, the fetus side facing the yolk sac is coated by a large columnar epithelial cells with basally placed core, with eosinophilic granules. The yolk contents basically comprised of cellular rich protein deposits, and eosinophilic. The distribution of the calf seems to present an organization in a "bunch of grapes" being the groups consisting of trabecular cells bring with blood vessels. In *Crotalus durissus*, the umbilical cord promotes the connection between fetal and maternal tissues and is a highly vascularized structure, consisting of two arteries and one vein, and the allantoic duct, surrounded by a mucoid tissue (mesenchymal).

Keywords: *Crotalus*. Placenta. Placentation. Rattlesnake. Snake.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	ESTUDO HISTOLÓGICO DO SACO VITELINO E CORDÃO UMBILICAL EM FETOS DE <i>Crotalus durissus</i> (OPHIDIA: VIPERIDAE).....	14
2.1	INTRODUÇÃO.....	15
2.2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.2.1	Introdução aos Reptilia.....	16
2.2.2	Biologia de serpentes.....	18
2.2.3	Família Viperidae: gênero <i>Crotalus</i>	25
2.2.4	Introdução aos amniota	27
2.2.5	Estratégias reprodutivas das serpentes	28
2.2.6	Placenta e placentação em serpentes	30
2.3	MATERIAL E MÉTODO.....	31
2.3.1	Animais	31
2.3.2	Coleta do material	32
2.3.3	Estudo histológico	33
2.3.4	Método Picrossirius red	34
2.4	RESULTADOS.....	35
2.4.1	Oviduto	35
2.4.2	Saco vitelino	36
2.4.3	Cordão umbilical	38
2.4.4	Placenta coriovitelina.....	38
2.5	DISCUSSÃO	40
2.6	CONSIDERAÇÕES.....	39
	REFERÊNCIAS	45

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas sobre a reprodução são fundamentais para entender a biologia das espécies (ALMEIDA-SANTOS et al., 2014). No entanto, com a diversidade de espécies, diferentes linhagens e complexidades ecológicas e climáticas, ainda há carência de informações sobre aspectos reprodutivos básicos em muitas espécies de serpentes tropicais (MARQUES; PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS, 2013). Para entender a biologia reprodutiva das serpentes, é preciso conhecer todas as características ecológicas, biogeográficas e comportamentais envolvidos na reprodução (ZACARIOTTI; GUIMARÃES, 2010).

Os amniota estão classificados no filo Chordata e subfilo Craniata, cujos embriões apresentam âmnio, córion e alantoide (tartarugas, squamata, crocodilianos, aves e mamíferos), além do saco vitelino presente em todos os vertebrados. Os vertebrados podem apresentar dois modos reprodutivos: oviparidade e viviparidade. A oviparidade ocorre quando o desenvolvimento fetal acontece fora do corpo da fêmea, onde os fetos são nutridos exclusivamente pelo vitelo. Em espécies vivíparas, os ovos são retidos no oviduto materno e nutridos pela mãe durante todo o desenvolvimento embrionário (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). Espécies ovíparas põem ovos cujos embriões estão cerca de um terço desenvolvidos, enquanto espécies vivíparas retêm os ovos até que o desenvolvimento fetal esteja completo (SHINE; THOMPSON, 2006).

Todas as espécies de serpentes apresentam reprodução interna, com a presença de dois hemipênis nos machos e por um par de ovários, ovidutos e vagina nas fêmeas (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; KOLESNIKOVAS; GREGO; ALBUQUERQUE, 2006).

Como amniota, as serpentes possuem quatro membranas extraembrionárias: âmnio, alantoide, córion e saco vitelino. O âmnio circunda o embrião e o líquido que o envolve; o alantoide armazena as excretas provenientes do metabolismo; o córion envolve todas as estruturas presentes no ovo; o saco vitelino armazena os nutrientes utilizados no desenvolvimento embrionário (GALDOS-RIVEROS et al., 2010; HICKMAN JR et al., 2013).

Nos répteis, a viviparidade evoluiu da oviparidade através da retenção, cada vez mais prolongada, dos ovos dentro do oviduto (PARKER; ANDREWS, 2006). A viviparidade em serpentes está presente em diversas linhagens, e é considerada uma

adaptação bem sucedida. Mantendo os ovos no corpo, a fêmea pode explorar locais quentes e frios, aproveitando o calor disponível no ambiente para elevar a temperatura corporal, permitindo aos embriões uma temperatura mais adequada para o seu desenvolvimento (SHINE; THOMPSON, 2006; PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS; MARQUES, 2006; KARDONG, 2010).

Estudos sobre a reprodução de serpentes envolvem principalmente pesquisas sobre os ciclos reprodutivos, padrões ecológicos e comportamentais (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012), mas pouco se sabe sobre a descrição anatômica das membranas fetais em espécies tropicais.

2 ESTUDO HISTOLÓGICO DO SACO VITELINO E CORDÃO UMBILICAL EM FETOS DE *Crotalus durissus* (OPHIDIA: VIPERIDAE)

2.1 INTRODUÇÃO

Pesquisas sobre a reprodução são fundamentais para entender a biologia das espécies (ALMEIDA-SANTOS et al., 2014). No entanto, com a diversidade de espécies, diferentes linhagens e complexidades ecológicas e climáticas, ainda há carência de informações sobre aspectos reprodutivos básicos em muitas espécies de serpentes tropicais (MARQUES; PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS, 2013). Para entender a biologia reprodutiva das serpentes, é preciso conhecer todas as características ecológicas, biogeográficas e comportamentais envolvidos na reprodução (ZACARIOTTI; GUIMARÃES, 2010).

Os amniota estão classificados no filo Chordata e subfilo Craniata, cujos embriões apresentam âmnio, córion e alantoide (tartarugas, squamata, crocodilianos, aves e mamíferos), além do saco vitelino presente em todos os vertebrados. Os vertebrados podem apresentar dois modos reprodutivos: oviparidade e viviparidade. A oviparidade ocorre quando o desenvolvimento fetal acontece fora do corpo da fêmea, onde os fetos são nutridos exclusivamente pelo vitelo. Em espécies vivíparas, os ovos são retidos no oviduto materno e nutridos pela mãe durante todo o desenvolvimento embrionário (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). Espécies ovíparas põem ovos cujos embriões estão cerca de um terço desenvolvidos, enquanto espécies vivíparas retêm os ovos até que o desenvolvimento fetal esteja completo (SHINE; THOMPSON, 2006).

Todas as espécies de serpentes apresentam reprodução interna, com a presença de dois hemipênis nos machos e por um par de ovários, ovidutos e vagina nas fêmeas (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; KOLESNIKOVAS; GREGO; ALBUQUERQUE, 2006).

Como amniota, as serpentes possuem quatro membranas extraembrionárias: âmnio, alantoide, córion e saco vitelino. O âmnio circunda o embrião e o líquido que o envolve; o alantoide armazena as excretas provenientes do metabolismo; o córion envolve todas as estruturas presentes no ovo; o saco vitelino armazena os nutrientes utilizados no desenvolvimento embrionário (GALDOS-RIVEROS et al., 2010; HICKMAN JR et al., 2013).

Nos répteis, a viviparidade evoluiu da oviparidade através da retenção, cada vez mais prolongada, dos ovos dentro do oviduto (PARKER; ANDREWS, 2006). A viviparidade em serpentes está presente em diversas linhagens, e é considerada uma

adaptação bem sucedida. Mantendo os ovos no corpo, a fêmea pode explorar locais quentes e frios, aproveitando o calor disponível no ambiente para elevar a temperatura corporal, permitindo aos embriões uma temperatura mais adequada para o seu desenvolvimento (SHINE; THOMPSON, 2006; PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS; MARQUES, 2006; KARDONG, 2010).

Estudos sobre a reprodução de serpentes envolvem principalmente pesquisas sobre os ciclos reprodutivos, padrões ecológicos e comportamentais (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012), mas pouco se sabe sobre a descrição anatômica das membranas fetais em espécies tropicais.

2.2 REVISÃO DA LITERATURA

2.2.1 Introdução aos Reptilia

Tradicionalmente, a classe Reptilia é composta por espécies viventes, como serpentes e crocodilos, e espécies extintas, como dinossauros e pterossauros (HICKMAN JR et al., 2013). Pesquisas recentes indicam que as aves possuem a mesma origem filogenética dos répteis (ZHANG; ZHOU, 2000; BALTER, 2013; ZHENG et al., 2013), pertencendo, portanto, à mesma linhagem evolutiva que os crocodilianos e os dinossauros - Archosauria (POUGH; JANIS; HEISER, 2008; WAGNER et al., 2014). Espécies de Reptilia compõem linhagens distintas, não sendo tão aparentadas entre si. Portanto, o grupo conhecido como “Répteis” não é considerado válido como um grupo monofilético (MARQUES; ABE; MARTINS, 1998).

As espécies de Reptilia atuais compreendem os clados Chelonia, Squamata, Crocodilia e Rhynchocephalia. O grupo Chelonia, ou Testudinata, é composto pelas tartarugas, cágados e jabutis, animais que apresentam uma proteção que reveste o animal, formada pela fusão da carapaça e do plastrão. A ordem Squamata é formada pelas subordens Serpentes (serpentes), Sauria (lagartos) e Amphisbaena (anfísbênias). A ordem Crocodilia abrange as espécies de crocodilos e jacarés e a ordem Rhynchocephalia

é composta pelas espécies de tuatara. O clado Lepidosauria abrange as ordens Rhynchocephalia e Squamata (ASPINALL; CAPPELLO, 2009; ZAHER et al., 2011).

Assim como os peixes e os anfíbios, os répteis são ectodérmicos, cujo metabolismo necessita de calor proveniente do ambiente externo (BARBO, 2008). No entanto, diferente dos anfíbios, os répteis não dependem da água para se reproduzirem, sendo os primeiros animais a pôr ovos com líquido e membrana amniótica (KOLESNIKOVA; GREGO; ALBUQUERQUE, 2006).

Os répteis podem ser ovíparos, espécies que põem ovos, ou vivíparos, onde o desenvolvimento do embrião ocorre no ovo no corpo da mãe; nesse caso, a fêmea dá a luz filhotes completamente formados (BENESI, 2007; ASPINALL; CAPPELLO, 2009). Nos répteis, a vivipariedade evoluiu da ovipariedade através da retenção, cada vez mais prolongada, dos ovos dentro do oviduto (PARKER; ANDREWS, 2006). Acredita-se que a evolução da viviparidade ocorreu por vantagens térmica, pois o desenvolvimento fetal ocorre no corpo da fêmea (SHINE; THOMPSON, 2006).

Os répteis estão presentes em todas as regiões, com exceção das calotas polares, e suas espécies podem ser herbívoras e carnívoras, sendo que neste último podem ser alimentar desde pequenos invertebrados a mamíferos de grande porte (BARBO, 2008).

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade no planeta (ARAÚJO; ALMEIDA-SANTOS, 2011), onde são conhecidas 721 espécies de répteis, a maior parte encontrada na Amazônia (SILVA; SOUZA; BERNARDE, 2010), abrigando uma das herpetofaunas mais ricas do mundo (MARQUES et al., 2009). A América do Sul, além da biodiversidade, possui linhagens filogenéticas endêmicas de serpentes, ou seja, exclusivas deste continente (MARQUES, 2011).

A extinção de populações raramente tem uma única causa; a população declina devido a uma variedade de fatores, incluindo a perda de habitat, doenças e mudanças climáticas (CLARK et al., 2011). Para os répteis, a perda de habitat é a principal ameaça de extinção (MARQUES et al., 2010). As espécies florestais, como as serpentes do gênero *Bothrops*, são mais vulneráveis, enquanto que espécies presentes em formações abertas, como a cascavel *Crotalus durissus*, são mais resistentes e oportunistas (BENESI, 2007).

2.2.2 Biologia de serpentes

Serpentes pertencem à Subordem Ophidia e compõem, junto com os lagartos e as anfisbênias, a Ordem Squamata (POUGH; JANIS; HEISER, 2008; PUZZI et al., 2008). A Ordem Squamata, unida aos tuatara (gênero *Sphenodon*), compõe o grupo dos Lepidosauria. No mundo são conhecidas e descritas aproximadamente 3700 espécies de serpentes, 4900 de lagartos e 200 espécies de anfisbênias (VIDAL; HEDGES, 2009).

As relações filogenéticas entre os principais grupos de serpentes ainda são confusas, onde é possível analisar resultados contrastantes resultantes de análises morfológicas e moleculares (GRAZZIOTIN et al., 2007). O padrão anatômico básico das serpentes, ou seja, o corpo alongado, embora seja uma característica distintiva, dificulta e promove incertezas quanto ao parentesco das linhagens, assim como a relação das serpentes com os lagartos (OGUIURA; FERRAREZZI; BATISTIC, 2009).

Além de apresentarem o corpo alongado, serpentes não possuem membros locomotores, cinturas escapular e pélvica (algumas espécies, como pítons e jiboias, possuem vestígios da cintura pélvica, porém não funcional). Apresentam o crânio altamente cinético, apresentam frouxas ligações entre os ossos craniais, permitindo a ingestão de presas muito maiores que seu próprio diâmetro (HICKMAN JR et al., 2013). As serpentes, ao contrário dos lagartos, não apresentam pálpebras móveis, mas uma escama transparente modificada, sendo ausente também o ouvido externo e as membranas timpânicas (SAVAGE, 2002).

Quanto às formas corpóreas, as serpentes podem ser robustas como as constritoras; compridas e ágeis, como as espécies orientadas pela visão; serpentes alongadas, com hábitos arborícolas; espécies escavadoras, com escamas lisas e olhos rudimentares; víboras, com corpo robusto e cabeça grande e as espécies marinhas, que possuem a cauda achatada lateralmente (POUGH; JANIS; HEISER, 2008).

A língua bifurcada das serpentes é um órgão neuromuscular especializado com função olfativa. É usada para rastrear presas e outras serpentes. Através da língua, a serpente examina constantemente o ambiente e a introdução de novos odores promove o aumento na atividade exploratória da língua (BECHTEL, 1995).

Serpentes são encontradas em quase todos os biomas do planeta, com exceção das regiões polares (MULLIN; SEIGEL, 2009), presentes principalmente nas regiões

tropicais e temperadas (ANDRADE et al., 2012). São exclusivamente predadoras, portanto carnívoras, e apresentam uma variada gama de itens alimentares (SANTOS et al., 2010), como artrópodes em geral, minhocas, peixes, anfíbios, lagartos, ovos de pássaros, morcegos e marsupiais, estando próximas ao ápice nas cadeias alimentares (BERNARDE; MACHADO, 2002).

A maioria das espécies se reproduzem por fecundação interna. A maioria põem ovos (oviparidade), mas algumas parem filhotes inteiramente formados (viviparidade) (BECHTEL, 1995). É provável que uma ninhada tenha diferentes pais, pois a fêmea copula várias vezes durante a época de acasalamento, principalmente quando a espécie pode estocar esperma (LUKOSCHEK; AVISE, 2011). Em répteis, a gestação e incubação não variam apenas de acordo com a espécie, mas a duração também é afetada pela temperatura (BECHTEL, 1995).

As famílias de serpentes de maior interesse no Brasil são: Boidae (cobra-papagaio, sucuri, jiboia, salamanta) (Figura 1); Colubridae (falsas corais, cobra d'água) (Figura 2); Viperidae (cascavel, surucucu-pico-de-jaca, jararaca) (Figuras 3, 4 e 5); Elapidae (corais verdadeiras) (Figura 6) e a família exótica Pitonidae (píttons) (KOLESNIKOVAS; GREGO; ALBUQUERQUE, 2006).

Das 371 espécies de serpentes registradas no Brasil, 55 são consideradas peçonhentas, 28 pertencem à família Viperidae e 27 à família Elapidae (BERNARDE; GOMES, 2012); as espécies peçonhentas pertencem aos gêneros *Bothrops* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis), *Lachesis* (surucucus) e *Micrurus* (corais verdadeiras) (RIBEIRO; JORGE, 1997; TOKARNIA; PEIXOTO, 2006).

Figura 1 - Serpentes da Família Boidae

Fonte: Fotos de Paulo Sérgio Bernarde. Disponível em <http://www.herpetofauna.com.br>

Legenda: **A)** Jiboia (*Boa constrictor constrictor*); **B)** Periquitambóia (*Corallus batesii*); **C)** *Corallus hortulanus*; **D)** Salamanta (*Epicrates cenchria*); **E)** *Corallus hortulanus*; **F)** Salamanta (*Epicrates cenchria*).

Figura 2 - Serpentes da Família Colubridae

Fonte: Fotos de Paulo Sérgio Bernarde. Disponível em <http://www.herpetofauna.com.br>

Legenda: **A)** Cobra-cipó (*Chironius exoletus*); **B)** Cobra-cipó (*Chironius scurrulus*); **C)** Limpa-pasto (*Drymarchon corais*); **D)** Cobra-cipó (*Leptophis ahaetulla*); **E)** *Oxybelis fulgidus*; **F)** Caninana (*Spilotes pullatus*).

Figura 3 - Cascavel *Crotalus durissus*, Família Viperidae

Fonte: Fotos de Paulo Sérgio Bernarde. Disponível em <http://www.herpetofauna.com.br>

Figura 4 - Serpentes do gênero *Lachesis*, Família Viperidae, conhecida popularmente como surucucu ou surucucu-pico-de-jaca

Fonte: Fotos de Paulo Sérgio Bernarde. Disponível em <http://www.herpetofauna.com.br>

Figura 5 - Serpentes do gênero *Bothrops*, Família Viperidae

Fonte: Fotos de Paulo Sérgio Bernarde. Disponível em <http://www.herpetofauna.com.br>

Legenda: **A)** Jararaca-verde ou Bico-de-papagaio (*Bothriopsis bilineata bilineata*); **B)** Jararaca-verde ou Bico-de-papagaio (*Bothriopsis bilineata bilineata*); **C)** Jararaca-verde ou Bico-de-papagaio (*Bothriopsis bilineata smaragdina*); **D)** Jararaca-verde ou Bico-de-papagaio (*Bothriopsis bilineata smaragdina*); **E)** Jararaca (*Bothrops brazili*); **F)** Jararaca ou Caissaca (*Bothrops moojeni*).

Figura 6 - Serpentes da Família Elapidae e gênero *Micrurus*

Fonte: Fotos de Paulo Sérgio Bernarde. Disponível em <http://www.herpetofauna.com.br>

Legenda: **A)** Coral-verdadeira (*Micrurus hemprichii*); **B)** Coral-verdadeira (*Micrurus lemniscatus*); **C)** Coral-verdadeira (*Micrurus remotus*); **D)** Coral-verdadeira (*Micrurus surinamensis*).

2.2.3 Família Viperidae: gênero *Crotalus*

A família Viperidae é composta por aproximadamente 270 espécies de serpentes, distribuídas em todos os continentes, com exceção da Antártida e Austrália (MACHADO, 2010). Viperídeos caracterizam-se por possuírem dentição do tipo solenóglifa, apresentarem fosseta loreal, pupila vertical, escamas carenadas e escamas pequenas no dorso da cabeça (BERNARDE, 2011) e presas dianteiras tubulares (VONK et al., 2008). Viperídeos apresentam comportamentos predatórios como apreensão da presa e inoculação da peçonha (SUEIRO; BRITES, 2006).

As serpentes conhecidas popularmente como cascavéis pertencem a dois gêneros: *Crotalus* e *Sistrurus* (HOSER, 2009), com aproximadamente 29 espécies (MURPHY et al., 2002). Na América do Sul a única espécie de cascavel é *Crotalus durissus* (WÜSTER; BÉRNILS, 2011), classificada em 14 subespécies (CÉSPEDES et al., 2010), segundo características morfológicas e de acordo com a distribuição geográfica (SANTORO et al., 1999).

A cascavel *Crotalus durissus* possui ampla distribuição geográfica, porém descontínua, ocorrendo naturalmente na América do Sul, com exceção do Equador e Chile (OGUIURA; FERRAREZZI; BATISTIC, 2009; COSTA et al., 2010).

Crotalus durissus é uma espécie terrestre, com hábitos crepusculares ou noturnos (BENESI, 2007), podendo também ser encontrada ativa durante o dia (HARTMANN; HARTMANN; MARTINS, 2009). Ativa em todos os meses do ano, mais comum na estação chuvosa, entre outubro e março, mas principalmente em fevereiro e março (SAWAYA; MARQUES; MARTINS, 2008).

A espécie ocorre em áreas abertas como o cerrado e campos, e, em áreas urbanas, bem como em regiões mais periféricas próximas às áreas rurais (CARVALHO; NOGUEIRA, 1998; BARBO; MARQUES; SAWAYA, 2011), podendo invadir áreas alteradas ou desmatadas (BENESI, 2007) e bordas de matas (HARTMANN; HARTMANN; MARTINS, 2009). O desmatamento devido à urbanização, aliado a abundância de roedores em ambientes urbanos, provavelmente facilitou a colonização da cascavel em áreas onde anteriormente ela não ocorria (BARBO; MARQUES; SAWAYA, 2011).

A espécie é vivípara, com vitelogênese longa, com início em março, e gestação entre outubro e janeiro (SAWAYA; MARQUES; MARTINS 2008; BARBO; MARQUES; SAWAYA, 2011). A cópula ocorre principalmente na primavera, e a fêmea pode armazenar espermatozoides para uma fecundação posterior, dificultando a precisão e determinação da gestação. O período de gestação varia de acordo com a espécie, bem como o número de filhotes; o período de incubação dos ovos é de aproximadamente dois meses (KOLESNIKOVAS; GREGO; ALBUQUERQUE, 2006), e os nascimentos ocorrem principalmente no mês de dezembro (BENESI, 2007).

Envenenamento por *Crotalus durissus* ocasiona, entre outros distúrbios, insuficiência renal aguda e alterações sistêmicas mais graves (OLIVEIRA et al., 2003; EVANGELISTA et al., 2008), propagando as toxinas do veneno por todo o corpo

(BORDON et al., 2012). O veneno crotálico também possui ação neurotóxica, podendo comprometer a musculatura respiratória, promovendo insuficiência respiratória aguda (AMARAL; MAGALHÃES; REZENDE, 1991).

2.2.4 Introdução aos amniota

O grupo dos amniota é composto por todos os tetrápodes vivos, com exceção dos anfíbios. Os amniota são representados pelos clados Testudinina (tartarugas), Lepidosauria (tuatara, lagartos e serpentes), Crocodilia (jacarés e crocodilos), Aves (aves) e Mammalia (mamíferos) (Figura 7) (POUGH; JANIS; HEISER, 2008).

Figura 7 - Diagrama ilustrando a relação filogenética dos tetrápodes. Os amniota compõem todas as espécies de répteis e aves (clados Lepidosauria, Testudines e Archosauria) e mamíferos

Fonte: Pough, Janis e Heiser (2008), adaptação de Carniatto (2014)

Os amniota apresentam fertilização interna e o desenvolvimento de tecidos extraembrionários (SHENG; FOLEY, 2012). A principal característica deste grupo é apresentar ovos com membranas extraembrionárias: córion, alantoide, âmnio e saco vitelino. O córion reveste todas as membranas embrionárias, assim como o feto. O

alantoide armazena os resíduos provenientes do metabolismo. O âmnio circunda o embrião, formando um meio líquido que permite o seu crescimento. O saco vitelino armazena os nutrientes que são utilizados no desenvolvimento embrionário (Figura 8) (THOMPSON et al., 2002; STEWART; RUSSELL; THOMPSON, 2012; HICKMAN JR et al., 2013; ELINSON; STEWART, 2014).

Figura 8 - Exemplo de ovo amniótico. O ovo dos amniota apresenta quatro membranas extraembrionárias: córion, alantoide, âmnio e saco vitelino. A casca mineralizada está presente em algumas espécies, como as aves e algumas espécies de lagartos

Fonte: Hickman Jr et al., (2013), adaptação de Carniatto (2014)

2.2.5 Estratégias reprodutivas das serpentes

As serpentes apresentam dois modos reprodutivos: viviparidade e oviparidade (ZACARIOTTI; GUIMARÃES, 2010). A oviparidade é considerada o modo reprodutivo primitivo, e a evolução da viviparidade ocorreu pelo menos 35 vezes entre as serpentes (ANDREWS; MATHIES, 2000; THOMPSON et al., 2004; HICKMAN JR et al., 2013).

Na oviparidade, a fêmea deposita os ovos no ambiente, e o desenvolvimento embrionário depende do vitelo como fonte nutricional. Na viviparidade, o desenvolvimento fetal ocorre dentro do corpo da fêmea, onde esta sustenta o desenvolvimento (Figura 9). Este processo é conhecido como matrotrofia. (STEWART; BRASCH, 2003; POUGH; JANIS; HEISER, 2008; KARDONG, 2010). Serpentes vivíparas, entretanto, são consideradas placentotróficas, pois os embriões em desenvolvimento são nutridos pela mãe via placenta (ZUG; VITT; CALDWELL, 2001).

Figura 9 - Relações fisiológicas entre os ovos de squamata e suas estruturas anexas

Fonte: Blackburn (1995), adaptação de Carniatto (2014)

Legenda: **A)** Viviparidade. **B)** Oviparidade. Em ambos os modelos reprodutivos, a membrana corioalantoide localiza-se no hemisfério dorsal do ovo, e o saco vitelino concentra-se no hemisfério ventral.

A oviparidade é o modo reprodutivo dominante entre os squamata (ANDREWS, 1997; MURPHY et al., 2012); a evolução da oviparidade para a viviparidade foi um processo gradual, exigindo mudanças fisiológicas e anatômicas como o desenvolvimento de estruturas vasculares que permitem as trocas gasosas entre o oviduto e os fetos e a presença de apenas uma fina camada (“casca de ovo”) revestindo os fetos no oviduto (SHINE; BULL, 1979; QUALLS; ANDREWS, 1999). Entretanto, há espécies que apresentam ambos os modos reprodutivos, como *Lacerta vivípara* (STEWART; HEULIN; SURGET-GROBA, 2004).

Acredita-se que o modo reprodutivo esteja relacionado ao clima; a oviparidade está relacionada a climas quentes, que permitem o desenvolvimento dos embriões no ambiente. A viviparidade é o modo reprodutivo de muitas espécies de clima frio, onde a

fêmea, com os ovos mantidos no interior do corpo, consegue manter a temperatura ideal para o desenvolvimento embrionário. No Brasil, a viviparidade ocorre em diversas espécies, como na cascavel (gênero *Crotalus*), jararacas (gêneros *Bothrops*, *Bothriopsis* e *Bothrocophias*) e alguns boídeos (gêneros *Boa*, *Epicrates*, *Eunectes* e *Corallus*) (SHINE, 2002; HODGES, 2004; GARCÍA-COLLAZO et al., 2012; FRAGA et al., 2013).

2.2.6 Placenta e placentação em serpentes

A placenta das serpentes e dos lagartos atua na troca de gases e no fornecimento de água e, em muitas espécies, permite a transferência de nutrientes entre a fêmea e os fetos. Nas serpentes, as placentas apresentam uma grande diversidade funcional e estrutural, e a morfologia placentária, assim como sua função, varia de acordo com as membranas envolvidas na formação da placenta (BECK, 1976; BLACKBURN; LORENZ, 2003).

Os squamata apresentam quatro categorias de placentação: placenta coriovitelina, onfaloplacenta, placenta onfalantoide e placenta corioalantoide (Quadro 1). Em todos os tipos, as placentas são compostas por tecidos maternos e tecidos fetais sobrepostos, com vestígios da “membrana da casca”, presente em espécies ovíparas (STEWART; THOMPSON, 2000; BLACKBURN; STEWART, 2011).

Quadro 1 - Tipos de placentação em serpentes vivíparas

Placenta	Componentes
Coriovitelina	Membrana coriovitelina + revestimento uterino
Corioalantoide (*)	Corioalantoide + revestimento uterino
Onfaloplacenta	Onfalopleura bilaminar + revestimento uterino
Onfalantoide (*)	Onfalotoide + revestimento uterino

Fonte: Blackburn e Stewart (2011) adaptação de Carniatto (2014)

Nota: As placentações com (*) persistem até o nascimento; as demais são transitórias

A placenta coriovitelina é composta por um saco vitelino trilaminar em aposição ao revestimento uterino materno. A membrana coriovitelina apresenta um fino epitélio,

ectoderma, recobrando a endo e a mesoderme. O tecido materno é formado por células epiteliais achatadas e capilares uterinos (BLACKBURN; STEWART, 2011).

Na placenta corioalantoide, ou alantoplacenta, há a sobreposição do corioalantoide sob o tecido de revestimento materno (BLACKBURN; STEWART, 2011). Todas as serpentes vivíparas possuem uma alantoplacenta, responsável pela troca de gases materno-fetais (BLACKBURN, 2000).

A onfaloplacenta se forma através da sobreposição de uma onfalopleura bilaminar sob os tecidos do útero materno. Quando a membrana alantoide penetra no saco vitelino, cria-se um complexo denominado placenta onfalantoide (BLACKBURN; STEWART, 2011).

2.3 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan e no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP).

Os métodos utilizados, o manuseio e a eutanásia dos animais estão 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 (FMVZ/USP), nº 2944/2013.

2.3.1 Animais

Foi utilizada uma serpente da espécie *Crotalus durissus* (cascavel), fêmea e adulta, medindo 108 cm e pesando 951 g, mantida em cativeiro no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, alojada individualmente em caixa própria e com livre acesso à água. Foram utilizados cinco fetos, com comprimento médio de 21,48 cm (Quadro 2).

Trata-se de uma espécie de difícil obtenção e, portanto, utilizamos apenas os fetos provenientes desta fêmea. Os fetos foram divididos e utilizados para o estudo histológico

das membranas fetais e cordão umbilical e para a caracterização das células do saco vitelino.

Quadro 2 - Medidas dos fetos de *Crotalus durissus* utilizados nesta pesquisa

Fetos	Comprimento
01	21,5 cm
02	21 cm
03	22 cm
04	21,7 cm
05	21,2 cm

2.3.2 Coleta do material

A serpente foi tranquilizada por meio de uma câmara contendo dióxido de carbono (CO₂), causando depressão direta do córtex cerebral. Em seguida, realizou-se a eutanásia através do fármaco Tiopental 30-100mg/kg, intracelomático. Como medida de segurança, avaliou-se a efetividade do procedimento, verificando a ausência de batimentos cardíacos, aguardando 30 minutos.

Para a remoção das placentas, a serpente foi posicionada em decúbito dorsal e, na região abdominal, foi realizada uma incisão no ventre, da base do pescoço à cloaca. A pele foi removida e os músculos abdominais rebatidos para expor o oviduto (Figura 10 A e B). Os fetos foram removidos juntamente com as membranas fetais e fixados em solução de formaldeído a 10% para o estudo histológico (Figura 10 C e D).

Figura 10 - Etapas da coleta dos fetos e membranas fetais da serpente *Crotalus durissus* para o estudo histológico

Fonte: Carniatto (2014)

Legenda: Em **A**, observamos a abertura da cavidade abdominal e medição dos sacos gestacionais. Em **B**, os ovidutos repletos de sacos gestacionais. Em **C**, observa-se um saco gestacional isolado ainda envolto pela parede do oviduto (pinça) Em **D**, o mesmo feto já removido do oviduto, no qual se destaca o proeminente saco vitelino (estrutura rósea).

2.3.3 Estudo histológico

Após o período de fixação os fetos foram dissecados e separados das membranas fetais para o processamento microscópico e estudo histológico (Figura 11). As membranas fetais, o saco vitelino e o cordão umbilical foram avaliados macroscopicamente e amostrados para inclusão em parafina. Para a inclusão as amostras foram desidratadas em uma série crescente de etanóis, de 70 a 100%, e diafanizado em xilol. Em seguida, foram imersas em uma mistura 1:1 de xilol e parafina por 45 minutos a 60 graus e por mais 45 minutos a 60 graus em parafina pura. Em seguida, o material foi incluído em parafina seguindo orientações pré-definidas para cada segmento. Os cortes de 5µm foram feitos em micrótomo automático (LEICA RM 2125RT) e corados por

hematoxilina-eosina e pelo Picrossiruius red para caracterização das fibras do sistema colágeno (MONTES; JUNQUEIRA, 1991).

Figura 11 - Dissecção das membranas fetais de um feto de *Crotalus durissus* fixado em solução de formaldeído 10%. As diferentes regiões das membranas fetais foram numeradas para sua caracterização histológica

Fonte: Carniatto (2014)

2.3.4 Método Picrossirius red

O sirius red é um corante muito utilizado para marcação histoquímica de fibras do sistema colágeno em cortes de tecido (MONTES et al., 1984). Os cortes histológicos, após a desparafinização, foram corados durante uma hora em solução 0,1% de Sirius red em ácido pícrico aquoso saturado, lavados em água corrente por 2 minutos e contracorados com Hematoxilina de Harris por 6 minutos. Em seguida, foram novamente lavados e montados.

2.4. RESULTADOS

A placenta das serpentes sofre mudanças significantes durante a gestação, pois os componentes celulares modificam-se de acordo com a necessidade do embrião/feto.

Poucos são os estudos que avaliaram e descreveram o desenvolvimento das membranas fetais em serpentes vivíparas. Na literatura há disponível descrições para 8 espécies representantes de 3 famílias. O padrão de desenvolvimento descrito nos estudos é consistente entre as espécies, sendo a única semelhança entre répteis vivíparos e ovíparos o desenvolvimento do saco vitelino.

Cinco membranas formam-se durante o desenvolvimento embrionário, âmnio, corioalantoide, onfalo-alantoide, membrana coriovitelina e onfalopleura bilaminar, sendo que as quatro últimas contribuem para a formação da placenta.

Neste estudo avaliamos as membranas fetais e o cordão umbilical de fetos de *Crotalus durissus* no estágio 35 de desenvolvimento (ZEHR, 1962).

2.4.1 Oviduto

A parede do oviduto, neste estágio da gestação, apresenta-se como uma estrutura muito delgada constituída por um epitélio de camada única de células cuboidais que repousa sobre uma lamina própria constituída por tecido conjuntivo frouxo e ricamente vascularizada (Figura 12 A). Não foram observadas glândulas na lamina própria. Abaixo da mucosa encontram-se duas camadas musculares lisas, sendo uma disposta longitudinalmente e a outra circularmente. Em certas regiões a mucosa do oviduto apresenta projeções semelhantes à vilos. A avaliação das fibras do sistema colágeno mostra que estas projeções são sustentadas por eixos de fibras colágenas que também permeiam em menor densidade da lamina própria (Figura 12 B e C).

Figura 12 - Estrutura microscópica do oviduto de fêmeas de *Crotalus durissus* no estágio 35 da gestação/ desenvolvimento embrionário

Fonte: Carniatto (2014)

Legenda: **A)** Delgada parede do oviduto evidenciando suas projeções e o epitélio cuboide. Coloração hematoxilina-eosina, aumento 40x. **B)** Fotomicrografia de pequeno aumento da parede do oviduto na região do polo embrionário, evidenciando as camadas musculares (*) e a lâmina própria (LP) ricamente vascularizada (seta). Coloração hematoxilina-eosina, aumento 10x. **C)** Fotomicrografia da parede do oviduto corada pelo método Picrossirius red evidenciando as fibras do sistema colágeno. Aumento 20x

2.4.2 Saco vitelino

O saco vitelino, neste estágio gestacional, mostra-se como uma estrutura proeminente, constituída pelo vitelo (Figura 13 A). A face voltada para o feto mostra-se revestida por um epitélio de células colunares grandes com núcleo posicionado basalmente. Estas células apresentam muitos grânulos eosinófilos (Figura 13 B). Já o revestimento epitelial nas regiões opostas ao feto mostra-se constituído por células escamosas sob o qual há uma rica vascularização capilar (Figura 13 C). O vitelo é constituído basicamente por depósitos celulares ricos em proteína e muito eosinófilos.

A distribuição do vitelo parece apresentar uma organização em forma de “cachos de uvas” sendo os ramos constituídos por trabéculas de células que trazem consigo vasos sanguíneos (Figura 13 D e E).

Figura 13 - Estrutura microscópica do saco vitelino em fetos de *Crotalus durissus* no estágio 35 da gestação/desenvolvimento embrionário

Fonte: Carniatto (2014)

Legenda: **A)** Saco vitelino (SV), feto (F), coloração hematoxilina-eosina, aumento 10x. **B)** Fotomicrografia de maior aumento do epitélio de revestimento da face voltada para o feto do saco vitelino. A seta indica as células colunares do epitélio repletas de grânulos citoplasmáticos eosinofílicos. Coloração hematoxilina-eosina, aumento 40x. **C)** Fotomicrografia de maior aumento do epitélio de revestimento da face oposta ao feto do saco vitelino. Nesta região o saco vitelino é revestido por um epitélio pavimentoso sob o qual uma extensa rede de capilares se distribui. Coloração hematoxilina-eosina, aumento 40x. **D e E)** Estrutura da organização do vitelo no saco vitelino. Os grânulos de distribuem em forma de “cachos de uva” e são sustentadas por trabéculas de tecido mesodérmico vascularizado (seta). Coloração hematoxilina-eosina, aumentos de 20 e 40x

2.4.3 Cordão umbilical

Assim como nos demais amniotas, nas serpentes o cordão umbilical faz a ligação entre os tecidos maternos e o feto. O cordão umbilical é constituído por duas artérias (A) e uma veia (V) e o ducto alantoide (DA), envoltos por um tecido mucoide (mesenquimal). Neste estágio do desenvolvimento ainda podem ser observados outros vasos que, segundo Almeida-Santos (2005) representam vasos vitelínicos (artéria, AV e veia, VV) (Figura 14). O fragmento do cordão avaliado neste estudo corresponde à região central de sua extensão.

Figura 14 - Estrutura microscópica do cordão umbilical de fetos de *Crotalus durissus* no estágio 35 da gestação/desenvolvimento embrionário

Fonte: Carniatto (2014)

Legenda: V, veia alantoidiana; A, artéria alantoidiana; VV, veia vitelínica; AV, artéria vitelínica; M, mesênquima (tecido mucoide); DA, ducto alantoidiano. Coloração hematoxilina-eosina, aumento 20x

2.4.4 Placenta corio-alantoidiana

A placenta coriovitelina no estágio de desenvolvimento 35 (ZEHR, 1962) em *Crotalus durissus* é constituída pela aposição do epitélio de revestimento do oviduto com a

membrana corio-alantoidina que recobre o hemisfério embrionário do “ovo”. Estas se interdigitam sutilmente e separando a membrana corio-alantoidinana e o revestimento do oviduto está um remanescente da casca do ovo, chamada de membrana da casca. Esta estrutura é extremamente delgada e parece ser continua por toda extensão onde há interação entre os tecidos maternos e fetais (Figura 15 A). A membrana corio-alantoidina é extremamente vascularizada por vasos de maior e menor calibre. Devido ao processamento histológico estas estruturas separam-se, porém, segundo estudos prévios, e mesmo durante a observação macroscópica notamos que elas estão em íntima aposição.

Quando avaliada a distribuição das fibras do sistema colágeno na placenta corio-alantoidina observamos que as fibras se distribuem irregularmente formando arcabouços de sustentação para os vasos e conferindo maior resistência nas regiões próximas a superfície logo abaixo do epitélio coriônico (Figura 15).

Figura 15 - Estrutura microscópica da membrana corio-alantoidiana de fêmeas de *Crotalus durissus* no estágio 35 da gestação/ desenvolvimento embrionário

Fonte: Carniatto (2014)

Legenda: **A)** Estrutura da membrana em menor aumento, a seta indica a membrana da casca e abaixo dela está o epitélio coriônico e o lantíde ricamente vascularizado (*). Coloração hematoxilina-eosina, aumento 10x. **B)** Membrana corio-alantoidiana corada pelo método Picrossirius red (PSH) para evidenciar as fibras do sistema colágeno (coradas em vermelho), onde se observa que estas fibras formam o arcabouço de sustentação do tecido allantoidiano e de seus vasos. **C)** Fotomicrografia de maior aumento também corada pelo (PSH) na qual se observa a organização da parede dos vasos allantoidianos (seta preta). Nos vasos menores não são observadas fibras colágenas (seta verde). Aumento de 40x

2.5 DISCUSSÃO

A cascavel *Crotalus durissus*, assim como *Bothrops alternatus*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. jararacassu*, *B. leucurus*, *B. moojeni*, *B. pauloensis* e *B. neuwidi*, é vivípara (LIRA-SILVA et al., 1994; MARQUES; KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2013; SILVA et al., 2013; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014). A viviparidade é a estratégia reprodutiva da maioria dos viperídeos brasileiros, com exceção de *Lachesis muta*, surucucu, espécie ovípara (PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS; MARQUES, 2006; SOUZA, 2007).

Em Squamata, a mudança da oviparidade para viviparidade evoluiu relativamente rápido através de modificações estruturais e funcionais na anatomia reprodutiva das espécies (BLACKBURN; FLEMMING, 2010), e estudos recentes investigam as pressões seletivas responsáveis por esta mudança (SHINE; THOMPSON, 2006).

Em *C. durissus*, o oviduto é dividido em infundíbulo, útero e vagina. Os fetos estão dispostos em ambos os úteros, direito e esquerdo, separados por constrições, isolando os embriões, mesmo padrão encontrado em outros estudos (LANGLADA; SANTOS; FERREIRA, 1994; ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002). Foram observados fetos em diferentes estágios de desenvolvimento, e ovos não fecundados, ao contrário do que é visto em fêmeas do lagarto *Sphenomorphus quoyii*, onde fêmeas capturadas na natureza, no mesmo período do ano, apresentam fetos com aproximadamente o mesmo estágio de gestação (THOMPSON, 1981).

Encontramos, em fetos de *C. durissus*, os quatro anexos embrionários dos amniota: córion, alantoide, âmnio e saco vitelino. Como em mamíferos vivíparos, as membranas fetais de *C. durissus* interagem com os tecidos uterinos para desenvolver uma placenta

responsável pela adesão do feto no útero, permitindo trocas gasosas e o transporte de água e nutrientes (DYKE; BRANDLEY; THOMPSON, 2014).

Em estágios finais do desenvolvimento gestacional, os fetos estudados apresentaram uma membrana corioalantoide, de coloração pálida, que reveste o feto e as demais membranas fetais. Esta membrana é a fusão do córion com o alantoide, através do contato da lâmina distal do alantoide com a superfície interna do córion, onde o alantoide envolve o saco amniótico e a superfície dorsal do saco vitelino, formando uma extensa membrana corioalantoide. Este padrão corrobora com outros trabalhos (BLACKBURN, 1993; ALMEIDA-SANTOS; ORSI; MIGLINO, 2003). A membrana corioalantoide também está presente em outras espécies de Squamata, como nos lagartos *Mabuya heathi* (BLACKBURN; VITT, 2002), *Lacerta vivipara* (STEWART; HEULIN; SURGET-GROBA, 2004), *Sceloporus aeneus* (CASTAÑOS et al., 2009) e *Eulamprus quoyii* (MURPHY et al., 2012).

Após a remoção da membrana corioalantoide, os fetos são revestidos pelo âmnio. O saco vitelino é o anexo embrionário mais interno, e seu conteúdo é abundante mesmo em fetos em avançado estágio gestacional.

Em *Crotalus durissus*, o saco vitelino permanece durante todo o desenvolvimento fetal, ao contrário do que é descrito em mamíferos (preguiça *Bradypus variegatus*, AMORIN et al., 2003; HILDEBRAND; GOSLOW, 2006; búfalos *Bubalus bubalis*, MORINI et al., 2008). Comparado a lagartos vivíparos, serpentes vivíparas fornecem mais nutrição para o desenvolvimento embrionário via saco vitelino (BLACKBURN et al., 2009), o que possivelmente explica sua permanência em todo o desenvolvimento fetal. Em *C. durissus*, o saco vitelino é uma membrana altamente vascularizada, assim como na serpente *Pantherophis guttatus* (ELINSON; STEWART, 2014).

Em contato com a membrana externa do saco vitelino há o vestígio de uma membrana da casca, estrutura também encontrada em outras espécies de répteis vivíparos (BLACKBURN; FLEMMING, 2010) e em *Eulamprus quoyii* (MURPHY et al., 2012).

A retenção do conteúdo vitelino em filhotes recém-nascidos ou recém-eclodidos também ocorre em diversas espécies de répteis como nas tartarugas *Caretta caretta* (BILLETT et al., 1992); *Trachemys dorbignyi* (MOLINA; GOMES, 1998); *Emydura macquarii* (THOMPSON et al., 1999), *Trachemys scripta elegans* (ROSSI; LOVATO; HÖFLING, 2006), no jacaré *Alligator sinensis* (LIU, 2013) e no lagarto *Mabuya mabouya*

(JEREZ; RAMÍREZ-PINILLA, 2001). O conteúdo vitelino, mesmo que residual, também está presente após a eclosão em pintos (PEDROSO et al., 2006; DYCE; SACK; WENSING, 2010) e em gansos (YANG et al., 2009; SHENG, 2010).

Todos os fetos analisados apresentaram um cordão umbilical, conectando o feto às membranas fetais da fêmea. Em estudo histológico, notou-se que o cordão é altamente vascularizado, permitindo trocas de nutrientes e gases entre os tecidos maternos e fetais, como ocorre em *Thamnophis sirtalis sirtalis* (ZEHR, 1962) e *Storeria dekayi* (BLACKBURN et al., 2009).

2.6 CONSIDERAÇÕES

Em estágios avançados de gestação, a parede do oviduto de *Crotalus durissus* apresenta-se como uma estrutura delgada, composta por um epitélio com células cuboidais, repousando em uma lâmina própria constituída por tecido conjuntivo.

A mucosa do oviduto de *Crotalus durissus* apresenta regiões com projeções semelhantes à vilos, sustentados por eixos de fibras colágenas.

Em estágios avançados de gestação, a face voltada para o feto do saco vitelino está revestida por um epitélio de células colunares grandes com núcleo posicionado basalmente, apresentando grânulos eosinófilicos.

O conteúdo vitelino é, basicamente, constituído por depósitos celulares ricos em proteína e muitos eosinófilicos. A distribuição do vitelo parece apresentar uma organização em forma de “cachos de uvas” sendo os ramos constituídos por trabéculas de células que trazem consigo vasos sanguíneos.

Em fetos de *Crotalus durissus*, o cordão umbilical promove a conexão entre os tecidos maternos e os fetos, sendo uma estrutura ricamente vascularizada.

Em estágios gestacionais avançados, a placenta de *Crotalus durissus* é constituída pela aposição do epitélio de revestimento do oviduto com a membrana corio-alantoidina que recobre o hemisfério embrionário do “ovo”. Estas se interdigitam sutilmente e, separando a membrana corio-alantoidinana e o revestimento do oviduto, está um remanescente da casca do ovo, chamada de membrana da casca.

A membrana corio-alantoidina da espécie estudada é extremamente vascularizada por vasos de maior e menor calibre.

Quando avaliada a distribuição das fibras do sistema colágeno na placenta corio-alantoidina observamos que as fibras se distribuem irregularmente formando arcabouços de sustentação para os vasos e conferindo maior resistência nas regiões próximas a superfície logo abaixo do epitélio coriônico.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Modelos reprodutivos em serpentes:** estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). 2005. 206 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ABDALLA, F. M. F.; SILVEIRA, P. F.; YAMANOUYE, N.; BRENO, M. C.; SALOMÃO, M. G. Reproductive cycle of the Neotropical *Crotalus durissus terrificus*: I. Seasonal levels and interplay between steroid hormones and vasotocinase. **General and Comparative Endocrinology**, Denver, v. 139, p. 143-150, 2004.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; BRAZ, H. B.; SANTOS, L. C.; SUEIRO, L. R.; BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; KASPEROVICZUS, K. N. Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados. **Herpetologia Brasileira**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 14-24, 2014.
- 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**, Belo Horizonte, v. 26, n. 2, p. 109-112, 2002.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ORSI, A. M.; MIGLINO, M. A. Chorioallantoic placenta in the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes-Viperidae). **Placenta**, Cambridge, v. 24, p. 36, 2003.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Long-Term Sperm-storage in female neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). **Japanese Journal of Herpetology**, Kyoto, v. 17, p. 46-52, 1997.
- AMARAL, C. F. S.; MAGALHÃES, R. A.; REZENDE, N. A. Comprometimento respiratório secundário a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus*). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, n. p. 251-255, julho, 1991.
- AMORIN, M. J. A. A. L.; MIGLINO, M. A.; AMORIN JÚNIOR, A. A.; SANTOS, T. C. Aspectos morfológicos da placenta da preguiça, *Bradypus variegatus* Shinz, 1825. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 217-226, 2003.

ANDRADE, R. S.; MONTEIRO, F. O. B.; RIBEIRO, A. S. S.; RUFFEIL, L. A. A. S.; CASTRO, P. H. G. Anatomia ultrassonográfica de fígado, baço e trato urogenital em jiboias. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, v. 55, n. 1, p. 66-73, 2012.

ANDREWS, R. M. Evolution of viviparity: variation between two sceloporine lizards in the ability to extend egg retention. **Journal of Zoology**, London, v. 243, p. 579-595, 1997.

ANDREWS, R. M.; MATHIES, T. Natural history of reptilian development: constraints on the evolution of viviparity. **BioScience**, Uberlândia, v. 50, n. 3, p. 227, 2000.

ARAÚJO, C. O.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Herpetofauna de um remanescente de cerrado no estado de São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 11, n. 3, p. 47-62, 2011.

ASPINALL, V.; CAPPELLO, M. **Introduction to veterinary anatomy and physiology textbook**. 2. ed. London: Butterworth Heinemann Elsevier, 2009.

BALTER, M. Dramatic fossils suggest early birds were biplanes. **Science**, New York, v. 339, p. 1261, 2013.

BARBO, F. E. Os répteis no Município de São Paulo: aspectos históricos, diversidade e conservação. In: MALAGOLI, L. R.; BAJESTERO, F. B.; WHATELY, M. (Org.). **Além do concreto: contribuições para a proteção da biodiversidade paulistana**. São Paulo: Instituto Socioambiental, 2008. v. 1, p. 234-267.

BARBO, F. E.; MARQUES, O. A. V.; SAWAYA, R. J. Diversity, natural history, and distribution of snakes in the municipality of São Paulo. **South American Journal of Herpetology**, São Paulo, v. 6, n. 3, p. 135-160, 2011.

BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Is rainfall seasonality important for reproductive strategies in viviparous Neotropical pit vipers? A case study with *Bothrops leucurus* from the Brazilian Atlantic Forest. **Herpetological Journal**, Montrose, v. 24, p. 67-75, 2014.

BARROS, V. A.; SUEIRO, L. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of the Neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of phylogenetic conservatism of reproductive patterns. **Herpetological Journal**, Montrose, v. 22, p. 97-104, 2012.

BECK, F. Comparative placental morphology and function. **Environmental Health Perspectives**. Washington, v. 18, p. 5-12, 1976.

BECHTEL, H. B. **Reptile and amphibian variants colors, patterns, and scales**. Malabar: Krieger Publishing Company, 1995.

BENESI, R. G. Q. Répteis do município de São Paulo. In: MAGALHÃES, A. F. A.; VASCONCELLOS, M. K. (Org.). **Fauna silvestre**: quem são e onde vivem os animais na metrópole paulista. São Paulo: Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente, 2007. p. 106-147.

BERNARDE, P. S.; MACHADO, R. A. Fauna reptiliana da Bacia do Rio Tibagi. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. (Ed.). **A bacia do Rio Tibagi**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2002. p. 291-296.

BERNARDE, P. S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 81, n. 1, p. 55-63, 2011.

BERNARDE, P. S.; GOMES, J. O. Serpentes peçonhentas e ofidismo em Cruzeiro do Sul, Alto Juruá, Estado do Acre, Brasil. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 42, n. 1, p. 65 -72, 2012.

BILLETT, F. S.; COLLINS, P.; GOULDING, D. A.; SUTHERLAND. The development of *Caretta caretta*, at 25-34°C, in Artificial Nests. **Journal of Morphology**, Malden, v. 213, p. 251-263, 1992.

BLACKBURN, D. G. Chorioallantoic placentation in squamate reptiles: structure, function, development, and evolution. **The Journal of Experimental Zoology**. Malden, v. 266, p. 414-430, 1993.

BLACKBURN, D. G. Saltationist and Punctuated Equilibrium Models for the Evolution of Viviparity and Placentation. **Journal of Theoretical Biology**, Ann Arbor, v. 174, p. 199-216, 1995.

BLACKBURN, D. G. Reptilian viviparity: past research, future directions, and appropriate models. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, Mmiami, v. 127, p. 391-409, 2000.

BLACKBURN, D. G.; ANDERSON, K. E.; JOHNSON, A. R.; KNIGHT, S. R.; GAVELIS, G. S. Histology and Ultrastructure of the Placental Membranes of the Viviparous Brown Snake, *Storeria dekayi* (Colubridae: Natricinae). **Journal of Morphology**. Malden, v. 270, p. 1137-1154, 2009.

BLACKBURN, D. G.; FLEMMING, A. F. Reproductive specializations in a viviparous African skink and its implications for evolution and conservation. **Herpetological Conservation and Biology**. Corvallis, v. 5, n. 2, p. 263-270, 2010.

BLACKBURN, D. G.; LORENZ, R. L. Placentation in Garter Snakes. II. Transmission EM of the Chorioallantoic Placenta of *Thamnophis radix* and *T. sirtalis*. **Journal of Morphology**, Malden, v. 256, p. 171-186, 2003.

BLACKBURN, D. G.; STEWART, J. R. Viviparity and Placentation in snakes. p. 119-181. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. (Ed.). **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. New Hampshire: Science Publishers, 2011.

BLACKBURN, D. G.; VITT, L. J. Specializations of the chorioallantoic placenta in the Brazilian scincid lizard, *Mabuya heathi*: a new placental morphotype for reptiles. **Journal of Morphology**, Malden, v. 254, n. 2, p. 121-131, 2002.

BORDON, K. C. F.; PERINO, M. G.; GIGLIO, J. R.; ARANTES, E. C. Isolation, enzymatic characterization and antiedematogenic activity of the first reported rattlesnake hyaluronidase from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochimie**, Paris, v. 94, p. 2740-2748, 2012.

CARVALHO, M. A.; NOGUEIRA, F. Serpentes da área urbana de Cuiabá, Mato Grosso: aspectos ecológicos e acidentes ofídicos associados. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 4, p. 753-763, 1998.

CASTAÑOS, M.; VILLAGRÁN, M.; RODRÍGUEZ, F.; MÉNDEZ, F.; HERNÁNDEZ, O.; MARTÍNEZ, A. Histología de las membranas extraembrionarias durante la retención intrauterina en *Sceloporus aeneus* (Squamata: Phrynosomatidae). **Acta Zoológica Mexicana**. Xalapa, v. 25, n. 2, p. 303-314, 2009.

CÉSPEDES, N.; CASTRO, F.; JIMÉNEZ, E.; MONTEALEGRE, L.; CASTELLANOS, A.; CAÑAS, C. A.; ARÉVALO-HERRERA, M.; HERRERA, S. Biochemical comparison of venoms from young Colombian *Crotalus durissus cumanensis* and their parents. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 16, n. 2, p. 268-284, 2010.

CLARK, R. W.; MARCHAND, M. N.; CLIFFORD, B. J.; STECHERT, R.; STEPHENS, S. Decline of an isolated timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) population: Interactions between climate change, disease, and loss of genetic diversity. **Biological Conservation**, Boston, v. 144, p. 886–891, 2011.

COSTA, H. C.; PANTOJA, D. L.; FEIO, R. N.; PONTES, J. L. Serpentes do município de Viçosa, Mata Atlântica do sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 10, p. 353-377, 2010.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

DYKE, J. U. V.; BRANDLEY, M. C.; THOMPSON, M. B. The evolution of viviparity: molecular and genomic data from squamate reptiles advance understanding of live birth in amniotes. **Reproduction**. London, v. 147, p. 15-26, 2014.

ELINSON, R. P.; STEWART, J. R. The corn snake yolk sac becomes a solid tissue filled with blood vessels and yolk-rich endodermal cells. **Biology letters**, London, v. 10, 2014.

EVANGELISTA, J. S. A. M.; MARTINS, A. M. C.; NASCIMENTO, N. R. F.; SOUSA, C. M.; ALVES, R. S.; TOYAMA, D. O.; TOYAMA, M. H.; EVANGELISTA, J. J. F.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MORAES, M. E. A.; MONTEIRO, H. S. A. Renal and vascular effects of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, Glasgow, v. 52, p. 737-744, 2008.

FERNER, K.; MESS, A. Evolution and development of fetal membranes and placentation in amniote vertebrates. **Respiratory Physiology & Neurobiology**. Bochum, v. 178, p. 39-50, 2011.

FRAGA, R.; LIMA, A. P.; PRUDENTE, A. L. C.; MAGNUSSON, W. E. **Guia de cobras da região de Manaus** - Amazônia Central. Manaus: Editora Inpa, 2013. 303 p.

GALDOS-RIVEROS, A. C.; REZENDE, L. C.; PESSOLATO, A. G. T.; MIGLINO, M. A. A relação biológica entre o saco vitelino e o embrião. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 6, n. 11, 2010.

GARCÍA-COLLAZO, R.; VILLAGRÁN-SANTA CRUZ, M.; MORALES-GUILLAUMIN, E.; LÁZARO, R. N. M.; MÉNDEZ-DE LA CRUZ, F. R. Egg retention and intrauterine embryonic development in *Sceloporus aeneus* (Reptilia: Phrynosomatidae): implications for the evolution of viviparity. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, México D. F., v. 83, p. 802-808, 2012.

GRAZZIOTIN, F. G.; ZAHER, H.; FERRAREZZI, H.; KLACZKO, J.; BONATTO, S. L.; WILKINSON, M. Higher-level molecular phylogeny of snakes: conflicts and congruence. **Darwiniana**, San Isidro, v. 45, p. 17-19, 2007.

HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T.; MARTINS, M. Ecologia e história natural de uma taxocenose de serpentes no Núcleo Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar, no sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 173-184 2009.

HICKMAN JR, C. P.; ROBERTS, L. S.; KEEN, S. L.; EISENHOUR, D. J.; LARSON, A.; L'ANSON, H. **Princípios integrados de zoologia**, 15. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

HILDEBRAND, M.; GOSLOW, G. **Análise da estrutura dos vertebrados**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2006.

HODGES, W. L. Evolution of viviparity in horned lizards (*Phrynosoma*): testing the cold-climate hypothesis. **Journal of Evolutionary Biology**. Lausanne, v. 17, p. 1230-1237, 2004.

HOSER, R. A reclassification of the Rattlesnakes; species formerly exclusively referred to the Genera *Crotalus* and *Sistrurus*. **Australasian Journal of Herpetology**, Melbourne, v. 6, p. 1-21, 2009.

JEREZ, A.; RAMÍREZ-PINILLA, M. P. The allantoplacenta of *Mabuya mabouya* (Sauria, Scincidae). **Journal of Morphology**, Malden, v. 249, p. 132-146, 2001.

KARDONG, K. V. **Vertebrados: anatomia comparada, função e evolução**. 5. ed. São Paulo: Roca, 2010.

KOLESNIKOVAS, C. K. M.; GREGO, K. F.; ALBUQUERQUE, L. C. R. Ordem Squamata - Subordem Ophidia (Serpente). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. P. 68-85.

LANGLADA, F. G.; SANTOS, S.; FERREIRA, I. L. L. Techniques of artificial insemination in *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae-Crotalinae). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 141-144, 1994.

LIRA-DA-SILVA, R. M.; CASAIS-E-SILVA, L. L.; QUEIROZ, I. B.; NUNES, T. B. Contribuição à biologia de serpentes da Bahia, Brasil. I. Vivíparas. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 11, n. 2, p. 187-193, 1994.

LIU, V. H. Chinese Alligators: observations at Changxing Nature Reserve & Breeding Center. **Reptiles & Amphibians**, Athens, v. 20, n. 4, p. 172-183, 2013.

LUKOSCHEK, V.; AVISE, J. C. Genetic monandry in 6 viviparous species of True Sea Snakes. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 102, n. 3, p. 347-351, 2011.

MACHADO, T. **Filogenia molecular das espécies de Bothrops do grupo neuwiedi (Serpentes, Viperidae)**. 2010. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MARQUES, O. A. V.; ABE, A. S.; M. MARTINS, M. Estudo diagnóstico da diversidade de répteis do Estado de São Paulo. In: CASTRO, R. M. C. (Ed.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo**. São Paulo: Fapesp, 1998. v. 6, p. 27-38.

MARQUES, O. Coleções, conservação e saúde pública. **BioBrasilis**, São Paulo, n. 2, p. 16-18, 2011.

MARQUES, O. A. V.; KASPEROVICZUES, K.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive ecology of the threatened pitviper *Bothrops insularis* from Queimada Grande Island, Southeast Brazil. **Journal of Herpetology**, Washington, v. 47, n. 3, p. 393-399, 2013.

MARQUES, O. A. V.; NOGUEIRA, C.; MARTINS, M.; SAWAYA, R. J. Impactos potenciais das mudanças propostas no Código Florestal Brasileiro sobre os répteis brasileiros. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 10, p. 1-3, 2010.

MARQUES, O. A. V.; PEREIRA, D. N.; BARBO, F. E.; GERMANO, V. J. ; SAWAYA, R. J. . Os répteis do Município de São Paulo: diversidade e ecologia da fauna pretérita e atual. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 9, p. 1-12, 2009.

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

MOLINA, F. B.; GOMES, N. Incubação artificial dos ovos e processo de eclosão em *Trachemys dorbignyi* (Duméril & Bibron) (Reptilia, Testudines, Emydidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 15, n. 1, p. 135-143, 1998.

MONTES, G. S.; COTTA-PEREIRA, G.; JUNQUEIRA, L. C. U. The connective tissue matrix of the vertebrate peripheral nervous system. **Advances in Cellular Neurobiology**, New York, v.5, p.177-218, 1984.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of the Picrosirius-Polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86, n. 3, p.1-11, 1991.

MORINI, A. C.; BARBOSA, P. L. G.; MELNIC, R. V.; JUNIOR, MORINI JUNIOR, J. C.; FRANCIOLLI, A. L. R.; MARTINS, D. S.; PEREIRA, F. T. V.; FAVARON, P. O.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Caracterização das membranas fetais em búfalas no terço inicial da gestação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 9, p. 437-445, 2008.

MULLIN, S. J.; SEIGEL, R. Opening doors for snake conservation. In: _____. **Snakes: ecology and conservation**. Ithaca: Cornell University Press, 2009. p. 1-4.

MURPHY, R. W.; FU, J.; LATHROP, A.; FELTHAM, J. V.; KOVAC, V. Phylogeny of the rattlesnakes (*Crotalus* and *Sistrurus*) inferred from sequences of five mitochondrial DNA genes. In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREEN, H. W. (Ed.). **Biology of Vipers**. Eagle Mountain: Eagle Mountain Publishing, 2002. p. 69-92.

MURPHY, B. F.; BRANDLEY, M. C.; MURPHY, C. R.; THOMPSON, M. B. Morphology and development of the placentae in *Eulamprus quoyii* group skinks (Squamata: Scincidae). **Journal of Anatomy**. Malden, v. 220, p. 454-471, 2012.

OGUIURA, N.; FERRAREZZI, H.; BATISTIC, R. F. Cytogenetics and molecular data in snakes: a phylogenetic approach. **Molecular Evolution and Phylogeny**, Urbana, v. 127, p. 128-142, 2009.

OLIVEIRA, D. G.; TOYAMA, M. H.; MARTINS, A. M. C.; HAVT, A.; NOBRE, A. C. L.; MARANGONI, S.; CÂMARA, P. R.; ANTUNES, E.; NUCCI, G.; BELIAM, L. O. S.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Structural and biological characterization of a crotapotin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, Glasgow, v. 42, p. 53-62, 2003.

PARKER, S. L.; ANDREWS, R. M. Evolution of viviparity in sceloporine lizards: in utero PO₂ as a developmental constraint during egg retention. **Physiological and Biochemical Zoology**, Chicago, v. 79, n. 3, 2006.

PEDROSO, A. A.; CHAVES, L. S.; LOPES, K. L. A. M.; LEANDRO, N. S. M.; CAFÉ, M. B.; STRINGHINI, J. H. Inoculação de nutrientes em ovos de matrizes pesadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 2018-2026, 2006.

PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; MARQUES, O. A. V. Biologia reprodutiva de serpentes brasileiras. In: NASCIMENTO, L. B.; OLIVEIRA, M. E. (Eds.) **Herpetologia no Brasil II**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia pp. 201-221, 2006. p. 201-221.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 4. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

PUZZI, M. B.; VICARIVENTO, N. B.; XAVIER, A.; POLIZER, K. A.; NEVES, M. F.; SACCO, S. R. Acidentes Ofídicos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 6, n. 10, p. 1-7, 2008.

QUALLS, C. P.; ANDREWS, R. M. Cold climates and the evolution of viviparity in reptiles: cold incubation temperatures produce poor-quality offspring in the lizard, *Sceloporus virgatus*. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 67, p. 353-376, 1999.

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

ROSSI, S.; LOVATO, E.; HÖFLING, J. C. Aspectos biológicos da tartaruga-de-orelha-vermelha, *Trachemys scripta elegans* (Reptilia, Testudines, Emydidae), em cativeiro. **Bioikos**, Campinas, v. 20, n. p. 33-40, 2006.

SANTORO, M. L.; SOUZA-E-SILVA, M. C. C.; GONÇALVES, L. R. C.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; CARDOSO, D. F.; LAPORTA-FERREIRA, I. L.; SAIKI, M.; PERES, C. A.; SANO-MARTINS, I. S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South America rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Miami, v. 122, p. 61-73, 1999.

SANTOS, M. B.; HUCKEMBECK, S. S.; BERGMANN, F. B.; TOZETTI, A. M. Comportamento alimentar aquático de *Liophis jaegeri* (Günther 1858) (Serpentes, Dipsadidae) em cativeiro. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 10, p. 343-346, 2010.

SAVAGE, J. M. **The amphibians and reptiles of Costa Rica**: a herpetofauna between two continents, between two seas. London: The University of Chicago Press, 2002.

SAWAYA, R. J.; MARQUES, O. A. V.; MARTINS, M. Composição e história natural das serpentes de Cerrado de Itirapina, São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 126-149, 2008.

SHENG, G. Primitive and definitive erythropoiesis in the yolk sac: a bird's eye view. **International Journal of Developmental Biology**, Bilbao, v. 54, p. 1033-1043, 2010.

SHENG, G.; FOLEY, A. C. Diversification and conservation of the extraembryonic tissues in mediating nutrient uptake during amniote development. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1271, p. 97-102, 2012.

SHINE, R.; Reconstructing an adaptationist scenario: what selective forces favor the evolution of viviparity in montane reptiles? **The American Naturalist**, Chicago, v. 160, N. 5, P. 582-593, 2002.

SHINE, R.; BULL, J. J. The evolution of live-bearing in lizards and snakes. **The American Naturalist**, Chicago, v. 113, p. 905-923, 1979.

SHINE, R.; THOMPSON, M. B. Did embryonic responses to incubation conditions drive the evolution of reproductive modes in squamate reptiles? **Herpetological Monographs**, Lawrence, v. 20, p. 159-171, 2006.

SILVA, K. M. P.; SUEIRO, L. R.; GALASSI, G. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reprodução de *Bothrops* spp. (Serpentes: Viperidae) em criadouro conservacionista. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 20, n. 4, p. 632-642, 2013.

SILVA, M. V.; SOUZA, M. B.; BERNARDE, P. S. Riqueza e dieta de serpentes do Estado do Acre, Brasil. **Revista Brasileira de Zoociências**, Juiz de Fora, v. 12, n. 2, p. 165-176, 2010.

SOUZA, R. C. G. Reproduction of the Atlantic Bushmaster (*Lachesis muta rhombeata*) for the First Time in Captivity. **Bulletin of Chicago Herpetological Society**, Chicago, v. 42, n. 3, p. 41-43, 2007.

STEWART, J. R.; BRASCH, K. R. Ultrastructure of the Placentae of the Natricine Snake, *Virginia striatula* (Reptilia: Squamata). **Journal of Morphology**, Malden, v. 255, p. 177-201, 2003.

STEWART, J. R.; HEULIN, B.; SURGET-GROBA, Y. Extraembryonic membrane development in a reproductively bimodal lizard, *Lacerta (Zootoca) vivipara*. **Zoology**, Olshausenstrasse, v. 107, p. 289-314, 2004.

STEWART, J. R.; RUSSELL, K. J.; THOMPSON, M. B. Development of Yolk Sac and Chorionallantoic Membranes in the Lord Howe Island Skink, *Oligosoma lichenigerum*. **Journal of Morphology**, Malden, v. 273, p. 1163-1184, 2012.

STEWART, J. R.; THOMPSON, M. B. Evolution of placentation among squamate reptiles: recent research and future directions. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, Miami, v. 127, p. 411-431, 2000.

SUEIRO, L. R.; BRITES, V. L. C. Táticas de captura e subjugação de presas no comportamento de predação da serpente *Crotalus durissus collilineatus* Amaral, 1926 em cativeiro. **Biotemas**, Florianópolis, v. 19, n. 4, p. 55-61, 2006.

THOMPSON, J. A study of the sources of nutrients for embryonic development in a viviparous lizard, *Sphenomorphus quoyii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**. Miami, v. 70A, n. 4, p. 509-518, 1981.

THOMPSON, M. B.; ADAMS, S. M.; HERBERT, J. F.; BIAZIK, J. M.; MURPHY, C. R. Placental function in lizards. **International Congress Series**. Tokyo, v. 1275, p. 218-225, 2004.

THOMPSON, M. B.; SPEAKE, B. K.; RUSSELL, K. J.; McCARTNEY, R. J.; SURAI, P. F. Changes in fatty acid profiles and in protein, ion and energy contents of eggs of the Murray short-necked turtle, *Emydura macquarii* (Chelonia, Pleurodira) during development. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, Miami, v. 122, p. 75-84, 1999.

THOMPSON, M. B.; STEWART, J.; SPEAKE, B. K.; HOSIE, M. J.; MURPHY, C. R. Evolution of viviparity: what can Australian lizards tell us? **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, Miami, v. 131, p. 631-643, 2002.

TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p. 55-68, 2006.

VIDAL, N.; HEDGES, S. B. The molecular evolutionary tree of lizards, snakes, and amphisbaenians. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 332, p. 132-139, 2009.

VONK, F. J.; ADMIRAAL, J. F.; JACKSON, K.; RESHEF, R.; BAKKER, M. A. G.; VANDERSCHOOT, K.; BERGE, I. V. D.; ATTEN, M. V.; BURGERHOUT, E.; BECK, A.; MIRTSCHIN, P. J.; KOCHVA, E.; WITTE, F.; FRY, B. G.; WOODS, A. E.; RICHARDSON, M. K. Evolutionary origin and development of snake fangs. **Nature**, New York, v. 454, p. 630-633, 2008.

WAGNER, G. P.; KIN, K.; MUGLIA, L.; PAVLIČEV, M. Evolution of mammalian pregnancy and the origin of the decidual stromal cell. **International Journal of Developmental Biology**, Bilbao, v. 58, p. 117-126, 2014.

WÜSTER, W.; BÉRNILS, R. S. On the generic classification of the rattlesnakes, with special reference to the Neotropical *Crotalus durissus* complex (Squamata: Viperidae), **Zoologia**, Curitiba, v. 28, n. 4, p. 417-419, 2011.

YANG, H. M.; WANG, Z. Y.; ZHU, X. H.; LU, J.; WANG, J. M. Effects of starter feeding time on yolk sac absorption of new hatched goslings. **Journal of Animal & Plant Sciences**, Lahore, v. 4, n. 3, p. 399-405, 2009.

ZACARIOTTI, R. L.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Aplicações da biotecnologia na reprodução de serpentes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 2, p. 98-104, 2010.

ZAHER, H.; BARBO, F. E.; MARTÍNEZ, P. S.; NOGUEIRA, C.; RODRIGUES, M. T.; SAWAYA, R. J. Répteis do Estado de São Paulo: conhecimento atual e perspectivas. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 11, p. 67-81, 2011.

ZEHR, D. R. Stages in the normal development of the common Garter snake, *Thamnophis sirtalis sirtalis*. **Copeia**, Washington, n. 2, p. 322-329, 1962.

ZHANG, F.; ZHOU, Z. A primitive enantiornithine bird and the origin of feathers. **Science**, New York, v. 290, p. 1955-1959, 2000.

ZHENG, X.; ZHOU, Z.; WANG, X.; ZHANG, F.; ZHANG, X.; WANG, Y.; WEI, G.; WANG, S.; XU, X. Hind wings in basal birds and the evolution of leg feathers. **Science**, New York, v. 339, p. 1309-1312, 2013.

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