DIEGO FERREIRA MUNIZ-DA-SILVA

Reprodução em crotalíneos:
Uterine Muscular Twisting
in vivo

São Paulo
2016

DIEGO FERREIRA MUNIZ-DA-SILVA

Reprodução em crotalíneos: Uterine Muscular Twisting *in vivo*

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

2016

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3354
FMVZ

Muniz-da-Silva, Diego Ferreira
Reprodução em crotalíneos: Uterine Muscular Twisting *in vivo* / Diego Ferreira Muniz-da-Silva. -- 2016.
75 f. : il.

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

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profª. Drª. Selma Maria Almeida-Santos.

1. Serpente. 2. Oviduto helicóide. 3. Progesterona. 4. Estradiol. 5. Ovariectomia.
I. Título.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil

Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505

ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Reprodução em viperídeos: Contração muscular uterina *in vivo*", **protocolo nº 988/12**, sob a responsabilidade de Selma Maria Almeida Santos e Diego Ferreira Muniz da Silva - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 20/02/2013.

Vigência do Projeto: 03/2013 - 03/2016	Nº de animais/espécie
Laboratório de Ecologia e Evolução	5 serpentes <i>Crotalus</i> (M), 30 serpentes <i>Crotalus</i> (F);

São Paulo, 26 de fevereiro de 2013

Dra. Wafa H. K. Cabrera

Vice-Coordenadora da CEUAIB

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MUNIZ-DA-SILVA, Diego Ferreira

Título: **Reprodução em crotalíneos:** Uterine Muscular Twisting *in vivo*

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Às minhas queridas cascavéis que tornaram,
com suas vidas, tudo isso possível: *Victória,*
Afraid, Diamond, Guizo-Marrom, Xena, Dotadão,
Chaveirinho, Gigante, Frígida, Brígida, Trígida e,
todas as outras *UMTs*. Para mim, nenhum (a) de
você(s) foram “apenas” animais de laboratório!

AGRADECIMENTO

À Dr^a. Selma Maria Almeida Santos, por ter acreditado nas minhas ideias e ter abraçado cada uma delas, por ter acreditado sempre em mim, mesmo quando fui utópico demais. Por todos os ensinamentos que me passou e, a cima de tudo, por ser *A Orientadora*, aquela que faz a gente se apaixonar pela pesquisa ao invés de carrega-la como um fardo.

Ao Dr. Otávio Augusto Vuolo Marques diretor do Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan (LEEV) por ter me recebido e me acolhido ao LEEV como parte da equipe.

Aos funcionários do LEEV Dr^a Maria José de J. Silva, MSc. Karina R. da Silva Banci e, MSc. Leonardo S. Kobashi pela grande ajuda com o processamento das amostras de sangue. A Kelly Kishi e Adriano T. Fellone por sempre estarem dispostos a me ajudar na aquisição de materiais indispensáveis a esse projeto. Ao Dr. Rogério Bertani pela grande ajuda com as fotografias em lupa estereoscópica. Aos colegas MSc. Viviane C. Garcia, Igor S. P. Federsoni e Ingrid V. Stein que em alguns momentos, durante discussões e conversas, sem se darem conta, contribuíram para ideias na elaboração desse trabalho. E aos demais colegas do LEEV, Dr^a Nancy Oguiura, Dr. Elkin Y. S. Villota, MSc. Camilla B. Di Nizo, MSc. Lorena C. B. de Lima, MSc. Lucas H. C. Siqueira, Silara F. Batista, Thiago H. Cinco, Luan P. O. Monteiro, Cristiene R. Martins, Maria M. Vendramini, Darina B. Favorito, Regina E. da Silva, Roberto M. do Nascimento, Vera L. M. Torres, Luis Miguel Lobo, Rafaela Z. Coeti, Ivan N. Cardoso, Eletra de Souza, Diego Mota, Andressa Barreto, Cris Ferreira Pires, Marlison Cruz e Erick A. Bassi, obrigado por fazerem parte da minha trajetória nesses mais de seis anos em que estive no LEEV. E em especial a Dona Marta, que todos os dias, com sorrisos estonteantes no rosto, manteve limpinho nosso ambiente de trabalho.

À Adriana Batista por ter se empenhado tanto a me ajudar a montar “A Sala do Diego”, o pedacinho do LEEV em que desenvolvemos a maior parte desse projeto.

Ao Dr. Carlos Jared e à Dr^a. Marta Antoniazzi por me receberem no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, e a Beatriz Maurício pela grande ajuda com a realização da Microscopia Eletrônica de Varredura.

À Dr^a Renata Guimarães Moreira Whitton e a MSc. Gabriela Brambila de Souza por terem me recebido gentilmente ao Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA) do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências-USP. Também por terem sido tão solícitas todas as vezes em que eu precisei de ajuda com material ou na realização da dosagem hormonal que foram fundamentais para a realização desse projeto.

Ao Dr. Ricardo Garcia Pereira, Dr. Marcílio Nichi e ao Ricardo Ciancio pela grande ajuda nos primeiros passos do meu projeto.

Ao amigo MSc. Paulo Ramos pela ajuda na realização de fotomicrográfas que ilustram essa tese, pela tentativa das imuno-histoquímicas e pelo companheirismo desde sempre na pós-graduação. Pronto, aqui está seu parágrafo, chorão (no entanto merecido).

Ao amigo Deyvid Amgarten pela revisão, comentários, sugestões e por ter conseguido tantos artigos antigos que eu não tinha acesso. Também por ter me tranquilizado dizendo que tudo estava fazendo sentido.

Ao amigo Diego Dias por aceitar um projeto de desenho de algo que ele não fazia ideia de como desenhar e pela paciência que teve todas as inúmeras vezes em que eu pedi para modificar os desenhos.

À MSc. Karina Maria P. Silva e ao Dr. Marcelo L. Santoro, por terem reservado um pouquinho do seu tempo para me ajudar muito com as análises estatísticas desse trabalho.

À Patrícia S. Marinho, pelos ensinamentos práticos ao meu primeiro contato com serpentes peçonhentas, e por ter dedicado tanto do seu tempo para me ajudar, principalmente no início dessa minha jornada, onde passou noites me ajudando com “meus animais”.

A toda a equipe de funcionários da Clínica Nato Medicina Veterinária pelo apoio, em especial ao MSc. Renato Zonzini Bocabello e a Juliana Paranhos por me disponibilizarem ajuda com a realização de alguns exames de diagnóstico por imagem que contribuíram para esse trabalho. E também a querida Fafá (Maria de Fátima R. da Silva) pela preocupação que teve durante os dias em que eu estava escrevendo, e escrevendo, e escrevendo esse tal de doutorado. E pelo carinho de fazer todas as tardes um café para me animar e levar “coisinhas” para eu comer.

À Maisa Assano Matuoka, Leandro Sanchez Gomes e Bruno Martins Da Costa que me ajudaram principalmente nos cuidados com “minhas serpentes”. Só quem já limpou fezes de cascavel sabe o quanto isso é uma demonstração de solidariedade. E quando as serpentes são do Di? Não basta limpar, esse cara chato pede para literalmente colocar o dedo na @%\$# e amassar todas as fezes. Por esses cuidados e ajuda, agradeço também a Jânio Mafra Bonfim, que muitas vezes esteve comigo nos finais de semana realizando esse “trabalho sujo”.

A Dr^a. Caroline Sayuri Fukushima, Alex Dos Santos Silveira, Priscila Maria Roswell, MSc. Fernanda Magno Amaral, Pedro Monteiro, MSc. Letizia Janaína Migliore e MSc. Kalena Barros Silva, amigos que me apoiaram não só no projeto, mas que em alguns momentos, cada um, foi/foram minha família aqui em São Paulo. E a Serena Najara Migliori, por ter me tirado o foco na realização desse trabalho tantas e tantas vezes, para me mostrar que as vezes perder o foco e *encadenar*¹ algumas vias te faz recarregar as energias e render mais no trabalho. Pronto nega, *encadenei* a tese!

A Dr^a Renata Guimarães Moreira Whitton, Dr^a. Marta Antoniazzi também por receberem e aceitarem com o maior carinho o meu convite para compor a Banca de Doutorado. Também por compor minha Banca de doutorado, Dr. Marcovan Porto que acreditou em mim desde quando eu *era pequenininho*², e; a Dr^a Paula de Carvalho Papa, por ser um exemplo de pesquisadora e por todo o carinho com o qual sempre me recebeu todas as vezes em que solicitei ajuda durante os seis anos e meios de minha vida na pós-graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, o qual tornou possível a realização desse projeto.

Ao programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres por me abrir as portas para a pós-graduação.

¹Encadenar: expressão usada para dizer que um escalador (a) durante todo o percurso da via não se apoiou na corda nem se segurou em algum objeto que não faça parte da linha natural da via. Concluindo com sucesso o objetivo da escalada.

²Quando (sujeito) era pequenininho: expressão usada por Selma Maria Almeida-Santos para referir a época em que uma pessoa estava iniciando sua vida acadêmica.

À minha família, pelo amor, apoio e por acreditarem tanto no meu sucesso. Em especial a meu irmão Giovane Ferreira Muniz da Silva, à minha irmã Giovana Ferreira Muniz da Silva, ao meu padasto Sebastião da Silva e ao meu sobrinho Gabriel Fernandes da Silva Mateus pelo apoio incondicional a escolha que fiz para minha vida profissional.

À Arli Ferreira da Silva, por ser sem dúvida a minha maior inspiração! A conclusão desse projeto é algo especial na minha vida, e mesmo que esse caminho tenha me levado para "*longe das suas asas*", contra a sua vontade, você sempre me apoiou, isso se chama AMOR! Obrigado por ser A Melhor Mãe do Mundo!

A Papai do Céu, um cara, ou uma *força maior*, que anda meio esquecido por todos (até por mim, confesso), mas que sem dúvida é o responsável pelo respeito, admiração, curiosidade e amor que eu nutri por toda forma de vida desde que *me entendo por gente*, e que sem dúvida foram os motivos que me impulsionaram a chegar até aqui.

Acho que não falta mais ninguém...

Ahhh claro!!! À Juliana Passos (risos)... Bom, na realidade a essa não cabe agradecimentos e sim um PARABÉNS!!! Essa sem dúvida foi uma tese do tipo "*prova em dupla*". Essa *baixinha tinhosa* embarcou nessa comigo na metade do caminho e desde então *não abandonou mais o barco*. Esteve comigo desde as cirurgias, que muitas vezes passavam as 23h de um sábado, até as bancadas dos laboratórios. Limpou mais fezes de cascavel do que eu mesmo. Se com essa tese eu conquistar meu título de Doutor (e estou confiante disso), saiba que esse título é nosso!!! De qualquer forma, obrigado por não me abandonar e não me deixar sozinho nesse barco mesmo depois das inúmeras vezes em que fui ríspido e exigente com você.

Enfim, agradeço a todos que me ajudaram mesmo que de forma simples e indireta na conclusão desse projeto, e que sem intenção eu não tenha mencionado por esquecimento, minhas sinceras desculpas e meu **muito obrigado!!!**

*“Compreender que há outros pontos de
vista é o início da sabedoria”
(Thomas Campbell)*

RESUMO

MUNIZ-DA-SILVA, D. F. **Reprodução em crotalíneos: Uterine Muscular Twisting *in vivo***. [Reproduction in pitvipers: Uterine Muscular Twisting *in vivo*]. 2016. 75 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Algumas serpentes necessitam obrigatoriamente estocar espermatozoides nos ovidutos para que os oócitos sejam fecundados, isso porque nessas espécies o período de cópula é distinto do período de ovulação. Em geral essa estocagem ocorre em receptáculos de estocagem encontrados na região infundibular. Em Crotalíneos a estocagem tem sido descrita como ocorrendo na região caudal dos ovidutos (junção útero-vaginal) em uma estrutura chamada de *Uterine Muscular Twisting* (UMT). Essa estrutura tem sido descrita como um *twisting* que se forma após a cópula e permanece presente até o momento da ovulação. Aqui demonstramos que a UMT não é formado por uma torção (*twist*) do oviduto e sim por uma helicoide formada pelas camadas internas da junção útero-vaginal. A UMT está presente em fêmeas ao longo de todo o ano, e não somente no período pós-cópula. Nós observamos que a UMT tem diferentes graus de formação, podendo ser forte, fraca ou ausente. A UMT forte é encontrada no período reprodutivo da fêmea (outono e inverno austrais) e está presente independentemente de haver espermatozoides nessa região. A UMT fraca é encontrada em todas as fêmeas maduras fora do período reprodutivo. Já a ausência de UMT é encontrada nas fêmeas prenhes e nas imaturas. Nossos resultados mostram que a UMT é formada mesmo em fêmeas ovariectomizadas com níveis basais de estradiol e que a progesterona é responsável pelo relaxamento da musculatura lisa do oviduto tornando a UMT ausente nas fêmeas.

Palavras-chave: Serpente. Oviduto helicoide. Progesterona. Estradiol. Ovariectomia.

ABSTRACT

MUNIZ-DA-SILVA, D. F. **Reproduction in pitvipers: Uterine Muscular Twisting *in vivo***. [Reprodução em crotalíneos: Uterine Muscular Twisting *in vivo*]. 2016. 75 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Some snakes need must store sperm in the oviduct so that the oocytes are fertilized, that because these species the mating period is distinct from ovulation period. Usually this occurs in receptacles found in the infundibular region. In pitvipers the storage has been described as occurring in the caudal region of oviduct (uterus-vaginal junction) in a structure named Uterine Muscular Twisting (UMT). This structure has been described as a twisting formed after mating and remains present until the time of ovulation. Here we demonstrate that the UMT is not formed by a twist (rotation around its own axis) of the oviduct but by a helicoid formed by the inner layers of the uterus-vaginal junction. The UMT is present in females throughout the whole year, not only in the post-copulation period. We note that the UMT has different degrees of shaping, can be strong, weak or absent. Strong UMT is found in the female reproductive period (austral autumn and winter) and is present regardless of whether sperm cells in this region. Weak UMT is found in all mature females outside the breeding season. Already the absence of UMT is found in pregnant females and the immature ones. Our results show that the UMT is formed even in ovariectomized with basal levels of estradiol and progesterone is responsible for relaxation of smooth muscle of the oviduct making UMT absent in females.

Keywords: Snake. Helical oviduct. Progesterone. Estradiol. Ovariectomy. Snake.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Camadas da junção útero-vaginal apresentando UMT	24
Figura 2 -	Terço caudal do corpo de <i>Crotalus durissus</i> evidenciando a UMT na junção útero-vaginal.	24
Figura 3 -	Vascularização da UMT	25
Figura 4 -	Aspecto macroscópico de <i>twisting</i> do oviduto com UMT.	26
Figura 5 -	Corte sagital da UMT mostrando as camadas mais externas em disposição longitudinal.	26
Figura 6 -	Junção útero-vaginal com UMT, após remoção de parte das fibras da camada muscular longitudinal externa	27
Figura 7 -	Desenho esquemático de uma helicoide de hélice longa.....	28
Figura 8 -	Corte sagital no plano mediano mostrando as duas abas da junção útero-vaginal com UMT de hélice longa.....	28
Figura 9 -	Vista do plano mediano da UMT	29
Figura 10 -	Corte sagital distal ao plano mediano da UMT de hélice longa.....	29
Figura 11 -	Desenho esquemático de uma helicoide de hélice curta	30
Figura 12 -	Corte sagital no plano mediano da junção útero-vaginal com UMT de hélice curta	30
Figura 13 -	Corte sagital distal ao plano mediano da junção útero-vaginal com UMT de hélice longa	31
Figura 14 -	Corte sagital da junção útero-vaginal que não apresenta UMT.....	31
Figura 15 -	Fêmea apresentando UMT visível através da serosa parietal.....	32
Figura 16 -	Fêmea apresentando UMT não visível devido a serosa parietal cobrir a estrutura	32
Figura 17 -	UMT ausente, junção útero-vaginal larga e lisa vista através da serosa parietal.....	33
Figura 18 -	Junção útero-vaginal larga e lisa do mesmo espécime da figura 17, visto sem a serosa parietal.....	33

Figura 19 - Junção útero-vaginal com UMT forte e fraca fixada em formaldeído 10%	34
Figura 20 - Ilustração das camadas que formam a UMT Forte, UMT Fraca e UMT Ausente	36
Figura 21 - Junção útero-vaginal de <i>Crotalus</i> imatura	54
Figura 22 - Junção útero-vaginal de <i>Crotalus</i> prenhe.....	54
Figura 23 - Oviduto de fêmea de <i>Crotalus durissus</i> durante o processo de ovulação	54
Figura 24 - Esquema representando o tipo de UMT antes e depois da aplicação exógena de progesterona	58
Tabela 1 - Sugestão de classificação da UMT quanto ao grau de formação (visualização)	35
Gráfico 1 - Relação da UMT com o status reprodutivo da fêmea	53
Gráfico 2 - Relação da UMT de fêmeas <i>Crotalus durissus</i> com a sazonalidade (austral)	55
Gráfico 3 - Relação da UMT de fêmeas <i>Crotalus durissus</i> com o ovário.....	56
Gráfico 4 - Relação dos níveis séricos de progesterona com o grau de formação da UMT em fêmeas <i>Crotalus durissus</i> com o ovário	56
Gráfico 5 - Relação da UMT de fêmeas <i>Crotalus durissus</i> ovariectomizadas com administração exógena de progesterona	57
Gráfico 6 - Relação da aplicação exógena de progesterona com a existência da UMT em <i>Crotalus durissus</i> ovariectomizadas	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	17
2	ANATOMIA E VARIAÇÕES NATURAIS DA <i>UTERINE MUSCULAR TWISTING</i>	20
2.1	INTRODUÇÃO.....	20
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
2.2.1	Animais.....	22
2.2.2	Lupa estereoscópica	22
2.2.3	Microscopia de luz.....	23
2.2.4	Microscopia eletrônica de varredura	23
2.3	RESULTADOS	23
2.3.1	Junção útero-vaginal.....	23
2.3.2	Vascularização da junção útero-vaginal.....	25
2.3.3	UMT – <i>Uterine Muscular Twisting</i>	25
2.3.4	Variações da UMT.....	27
2.3.5	Variação na visibilidade da UMT	32
2.3.5.1	Pré-fixação (tecido a fresco).....	32
2.3.5.2	Pós-fixação.....	34
2.3.6	Classificação da UMT.....	35
2.4	DISCUSSÃO	37
2.5	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	41
3	INFLUÊNCIA DE FATORES ENDÓGENOS E EXÓGENOS NA FORMAÇÃO DA <i>UTERINE MUSCULAR TWISTING</i>	45
3.1	INTRODUÇÃO.....	45
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.2.1	Animais.....	48
3.2.2	Maturidade sexual das fêmeas de <i>Crotalus durissus</i>	48
3.2.3	Delineamento experimental	49
3.2.3.1	Experimento 1: Relação da condição reprodutiva com a UMT.....	49
3.2.3.2	Experimento 2: Relação da sazonalidade com a UMT	49

3.2.3.3	Experimento 3: Relação do estradiol com a UMT	49
3.2.3.4	Experimento 4: Relação da progesterona com a UMT	50
3.2.4	Dosagem hormonal	50
3.2.5	Classificação da UMT	51
3.2.6	Celiotomia	51
3.2.7	Protocolo anestésico	51
3.2.8	Protocolo de eutanásia	52
3.2.9	Análise estatística	52
3.3	RESULTADOS	53
3.3.1	Maturidade sexual das fêmeas de <i>Crotalus durissus</i>	53
3.3.2	Relação da condição reprodutiva com a UMT	53
3.3.3	Relação da ovulação com a UMT	54
3.3.4	Relação da sazonalidade com a UMT	55
3.3.5	Relação do estradiol com a UMT	55
3.3.6	Relação da progesterona com a UMT	56
3.4	DISCUSSÃO	58
3.4.1	Maturidade sexual das fêmeas de <i>Crotalus durissus</i>	58
3.4.2	Relação da sazonalidade e condição reprodutiva com a UMT	59
3.4.3	Relação do estradiol com a UMT	60
3.4.4	Relação do sêmen com a UMT	61
3.4.5	Relação da progesterona com a UMT	62
3.4.6	Ausência e presença de UMT	64
3.5	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66
4	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	74

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

Em 1943, Ludwig e Rahn identificaram uma região torcida na porção anterior (cranial) da vagina, que na realidade trata-se da junção útero-vaginal, com grande concentração de espermatozoides em relação ao resto do oviduto em *Crotalus viridis viridis*. Esses autores relataram esse local como sendo uma região de estocagem de espermatozoides e devido a aparência enrolada dessa estrutura os autores a chamaram de “*coiled tube*”.

Em 1982, Nilson e Andrén identificaram uma região torcida (*convoluted*) no útero posterior de *Vipera berus* que provavelmente trata-se da mesma estrutura observada por Ludwig e Rahn (1943), no entanto esses autores atribuem a essa estrutura a função de um “*plug* copulatório”, uma formação que dificultaria a inseminação de uma fêmea recém inseminada, por outros machos. Já Stille, Madsen e Niklasson (1986), sugerem que essa torção em *Vipera berus* tem a função de evitar o escorrimento do sêmen após a cópula.

Em 1997 Almeida-Santos e Salomão encontraram essa mesma estrutura em *Crotalus durissus* e observaram que algumas fêmeas apresentavam a torção, enquanto que outras não, concluíram também, que não se tratava de uma condição permanente, e sim, de uma estrutura sazonal, que estaria presente apenas no período que compreende o intervalo entre pós-cópula e a ovulação, tratando-se provavelmente de uma região de estocagem de espermatozoides. Almeida-Santos e Salomão, em 2002, denominaram essa estrutura de *Uterine Muscular Twisting*, e a sigla UMT passou a ser amplamente utilizada para relatar a existência dessa torção em outros crotalíneos (e. g. ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; ALMEIDA-SANTOS, 2005; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a,b).

A espécie *Crotalus durissus* é um ótimo modelo experimental para o estudo da UMT, observado em viperídeos, por ser uma espécie com o ciclo reprodutivo já bem descrito na literatura (e. g. ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997, 2002; SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2002; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004).

Sabe-se que os machos de *Crotalus durissus* possuem um padrão reprodutivo anual, onde a espermatogênese tem início na primavera e o pico de produção dos gametas ocorre no verão (SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2002). Como o período

de cópula da espécie ocorre no outono, os machos estocam os espermatozoides produzidos durante o verão nos ductos deferentes até o momento da cópula, no outono (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004).

Durante o período de cópula as fêmeas iniciam a vitelogênese (SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2002), que é o processo de depósito de vitelo nos folículos (HO, 1991). Esse processo ocorre do outono ao inverno, e ao final da vitelogênese ocorre a ovulação, na primavera (SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2002).

Durante esse período de desenvolvimento folicular, os espermatozoides que foram depositados no oviduto da fêmea, pelo macho durante a cópula, permanecerão estocados na porção caudal do útero por meio da UMT (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997, 2002). A estocagem de espermatozoides no sistema reprodutor feminino se faz necessária uma vez que o acasalamento e a ovulação, na espécie, ocorrem em períodos distintos do ciclo reprodutivo (SCHUETT, 1992).

Após a fecundação começa o desenvolvimento dos embriões. Nas fêmeas de *Crotalus durissus*, esse desenvolvimento ocorre do final da primavera ao verão, finalizando o ciclo reprodutivo dessa espécie (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002).

Após a parturição, as fêmeas entram em um período de quiescência folicular e darão início a um novo ciclo ovariano no outono do ano seguinte. Diferentemente dos machos, o desenvolvimento dos gametas nas fêmeas se dá a cada dois anos, caracterizando um ciclo bienal (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002).

*Anatomia e variações
naturais da
Alterine Muscular Existing*

2 ANATOMIA E VARIAÇÕES NATURAIS DA *UTERINE MUSCULAR TWISTING*

2.1 INTRODUÇÃO

O sistema reprodutor feminino das serpentes é formado por dois ovários pareados, ocos e alongados que estão ligados à parede dorsal do corpo por um mesovário (JONES, 1978). Cada ovário é coberto por um fino epitélio e contém folículos e corpo lúteo incorporados em um estroma de tecido conjuntivo. Na superfície dorsal dos ovários estão presentes pequenas regiões que representam as camadas germinativas onde ocorre a multiplicação de oogônias e formação de folículos primordiais (GURAYA, 1989). Diferente das aves e mamíferos, o estroma ovariano dos répteis é escasso e possui pouco tecido intersticial (JONES, 2011).

Além dos ovários, o sistema reprodutor é composto por dois ovidutos derivados dos ductos mesonéfricos (FOX, 1977). Os ovidutos são pareados, sendo o direito mais longo do que o esquerdo (PERKINS; PALMER, 1996) ou mesmo, o oviduto esquerdo ausente em algumas espécies basais (ALDRIDGE, 1992; BLACKBURN, 1998). Os ovidutos podem ser divididos em várias regiões de acordo com a estrutura e a função dessas regiões. Basicamente essas regiões podem ser denominadas de: infundíbulo, tuba, istmo, útero e vagina (URIBE et al., 1998; GIRLING, 2002; SIEGEL et al., 2011a,b). O útero pode ainda ser dividido em duas porções: a porção glandular, onde estão presentes as glândulas endometriais, e a porção aglandular, região caudal do oviduto, onde não se encontram glândulas (SIEGEL et al., 2011a).

A terminologia utilizada para as regiões do oviduto é ampla e muitas vezes confusa devido aos autores utilizarem nomenclaturas diferentes para uma mesma estrutura (GIRLING, 2002). Como um exemplo disso, temos a vagina podendo ser denominada de bolsa (SIEGEL et al., 2011b), a tuba podendo receber o nome de infundíbulo posterior (FOX, 1956; SAINT-GIRONS, 1975; FOX, 1977; HALPERT; GARSTKA; CREWS, 1982; BLACKBURN, 1998; SEVER; RYAN, 1999; ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; ROJAS, 2009; SIEGEL et al., 2011a), e as regiões glandular e aglandular do útero sendo denominadas de útero anterior e útero posterior

respectivamente (GUILLETTE; FOX; PALMER, 1989; BLACKBURN, 1998; ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; ROJAS, 2009).

O oviduto possui uma série de funções: produção de albumem; produção da casca do ovo; placentação; oviposição ou parturição, e; estocagem de espermatozoides, ver revisão em Girling (2002). A estocagem de espermatozoides pode ocorrer em dois locais distintos do oviduto. Na maioria das vezes, ocorre em receptáculos seminais que se localizam na tuba uterina (FOX, 1956; SAINT-GIRONS, 1975; FOX, 1977; HALPERT; GARSTKA; CREWS, 1982; PERKINS; PALMER, 1996; BLACKBURN, 1998; SEVER; RYAN, 1999; SIEGEL et al., 2011a) local onde ocorre uma estocagem de longa duração (*Long-Term Storage Sperm*) (HALPERT; GARSTKA; CREWS, 1982) e a junção útero-vaginal, no útero aglandular (LUDWIG; RAHN, 1943; HALPERT; GARSTKA; CREWS, 1982; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997), onde ocorre uma estocagem de curta duração (*Short-Term Storage Sperm*) (HALPERT; GARSTKA; CREWS, 1982). A região de estocagem na junção útero-vaginal ocorre em uma torção do útero aglandular (LUDWIG; RAHN, 1943; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO 1997) denominada de *Uterine Muscular Twisting* (UMT) (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO 2002).

A UMT tem sido reportada como local de estocagem de espermatozoides em várias espécies de crotalíneos (e. g. ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997, 2002; ALMEIDA-SANTOS, 2005; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a,b). No entanto, Siegel e Sever (2006), negam a existência de torção ou qualquer enrolamento nos exemplares de *Agkistrodon piscivorus*, *Sistrurus miliarius* e *Crotalus durissus* estudados por eles. Os autores questionam a existência desse fenômeno e afirmam que a torção (*twisting*) do útero seria fisicamente impossível, uma vez que o oviduto está ligado à parede interna do corpo por um mesentério com vasos sanguíneos e inervações.

Embora a UMT seja uma estrutura macroscópica, as poucas imagens que ilustram essa estrutura na literatura são desenhos esquemáticos (e. g. LUDWIG; RAHN, 1943; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997) ou fotografias de animais preservados em coleções científicas (e. g. YAMANOUYE et al., 2004; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a) que na maioria das vezes sofrem alterações morfológicas em razão a má fixação. O estudo morfológico de junções útero-vaginal de *Crotalus durissus* utilizando peças frescas nos permitiu a obtenção de imagens de alta qualidade da estrutura da UMT e

um melhor entendimento da anatomia e fisiologia da formação dessa região do oviduto.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Animais

Utilizamos 10 *Crotalus durissus* fêmeas adultas e juvenis do Instituto Butantan. O projeto possui autorização do Ministério do Meio Ambiente (número de autorização: 37319/1) para utilização dos espécimes silvestres. A autorização foi expedida com base na Instrução Normativa nº154/2007. Fizemos a eutanásia dos animais com uma overdose de barbitúrico, com o fármaco tiopental em uma dose de 100 mg/kg intracelomático, seguindo as normas da Resolução nº 1000/2012-CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária). Como medida de segurança, fizemos a avaliação da efetividade do procedimento verificando a ausência de batimentos cardíacos, procedimento recomendado pelo Manual Prático sobre Usos e Cuidados Éticos de Animais de Laboratório, 1ª Edição; p. 104 (TAMBOURGI et al., 2010). Após a eutanásia e coleta dos tecidos de interesse ao projeto, encaminhamos as carcaças dos animais para incineração no Instituto Butantan.

2.2.2 Lupa estereoscópica

Analisamos a morfologia externa da junção útero-vaginal logo após eutanásia dos animais, antes da fixação da estrutura, com auxílio de uma lupa estereoscópica. Em seguida, fixamos as peças em formaldeído 10% por vinte quatro horas para preservar a morfologia das estruturas. Após fixação, analisamos novamente as peças externamente e então realizamos um corte sagital no plano mediano para análise da morfologia interna.

2.2.3 Microscopia de luz

Removemos a junção útero-vaginal da cavidade celomática e fixamos em formaldeído 10% por vinte e quatro horas. Em seguida preparamos a peça para cortes sagitais utilizando-se a metodologia usual para confecção de lâminas histológicas e coloração por hematoxilina e eosina (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

Removemos a junção útero-vaginal da cavidade celomática e fixamos em formaldeído 10% por vinte e quatro horas. Após esse período as amostras foram lavadas em água corrente e preservadas em álcool 70% até o processamento para microscopia eletrônica de varredura (MEV). Preparamos as peças para visualização de corte sagital no plano mediano das estruturas. O processamento seguiu metodologia usual (DYKSTRA, 1993).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Junção útero-vaginal

A junção útero-vaginal faz parte do útero aglandular e encontra-se na porção caudal dos ovidutos, localizada no terço caudal do corpo da serpente.

A junção útero-vaginal é formada por três camadas, sendo da mais interna para a mais externa: mucosa (endométrio); muscular (miométrio), subdividida em muscular circular interna e muscular longitudinal externa, e; serosa visceral (perimétrio) (Figura 1).

Figura 1 - Camadas da junção útero-vaginal apresentando UMT

Legenda: Luz (**L**); mucosa (**mu**); camada muscular circular interna (**mc**); camada muscular longitudinal externa (**ml**), e; serosa (**sr**). Corte transversal. HE. Foto: Arquivo pessoal.

A UMT, quando presente, encontra-se na região da junção útero-vaginal (Figura 2).

Figura 2 - Terço caudal do corpo de *Crotalus durissus* evidenciando a UMT na junção útero-vaginal

Legenda: Abertura da cloaca (**acl**); vagina direita (**vgd**); *uterine muscular twisting* (**umt**). Foto: Arquivo pessoal.

2.3.2 Vascularização da junção útero-vaginal

A irrigação dessa região é feita por ramos da artéria hipogástrica e a drenagem por ramos da veia porta renal (Figura 3).

Figura 3 - Vascularização da UMT

Legenda: Rim direito (**rmd**); rim esquerdo (**rme**); vagina esquerda (**vge**); artéria hipogástrica (**ahg**); *uterine muscular twisting* (**umt**); intestino (**in**), e; veia porta renal (**vpr**). Foto: Arquivo pessoal.

2.3.3 UMT – *Uterine Muscular Twisting*

A junção útero-vaginal apresenta um falso aspecto macroscópico de torção quando a UMT está presente. Aparentando uma torção do oviduto sobre seu próprio eixo (*twisting*) (Figura 4).

Figura 4 - Aspecto macroscópico de *twisting* do oviduto com UMT

Legenda: Vagina direita (**vgd**); *uterine muscular twisting* (**umt**). Foto: Arquivo pessoal.

A estrutura da junção útero-vaginal, que apresenta UMT, tem as camadas mais internas (luz do órgão, mucosa e musculatura circular interna) se arranjando em um padrão helicoidal anti-horário, enquanto que as camadas mais externas (musculatura longitudinal externa e serosa visceral) se dispõem longitudinalmente (Figura 5), não havendo qualquer torção nessas camadas.

Figura 5 - Corte sagital da UMT mostrando as camadas mais externas em disposição longitudinal

Legenda: Serosa (**sr**); camada muscular longitudinal externa (**ml**); camada muscular circular interna (**mc**); vasos sanguíneos (**vs**), e; luz (**L**). Corte sagital. HE. Foto: Arquivo pessoal.

Quando se remove a serosa visceral e a camada muscular longitudinal externa da junção útero vaginal, torna-se mais visível a formação helicoidal das estruturas internas da UMT (Figura 6).

Figura 6 - Junção útero-vaginal com UMT, após remoção de parte das fibras da camada muscular longitudinal externa

Legenda: Note a conformação ondular das fibras da camada muscular externa longitudinal que estão mais próximas da camada muscular circular em razão da formação helicoidal das camadas mais internas. Foto: Arquivo pessoal.

2.3.4 Variações da UMT

Existe variação na helicoide que forma a UMT. Em alguns casos essa helicoide possui a hélice longa (Figura 7), fazendo com que a luz do órgão rote longe do eixo central e por isso em um corte sagital não se obtém a luz do oviduto disposto em longitudinal (Figura 8).

Figura 7 - Desenho esquemático de uma helicoide de hélice longa

Legenda: Tubo azul representa a helicoide; eixo central (z), e; raio da hélice (r). Note que a rotação ocorre longe do eixo central em razão do tamanho do raio da hélice (hélice longa). Desenho: Arquivo pessoal.

Figura 8 - Corte sagital no plano mediano mostrando as duas abas da junção útero-vaginal com UMT de hélice longa

Legenda: Luz (L). Note que a luz do oviduto rota ao redor do eixo central do oviduto. Lupa estereoscópica. Foto: Arquivo pessoal.

A UMT helicoide de hélice longa é vista em um corte sagital no plano mediano do oviduto como duas colunas paralelas com vários cortes transversais, formados pela mucosa e luz do órgão, dispostos em diagonal com os cortes transversais da coluna

contralateral (Figura 9). Já em cortes sagitais paralelos distais ao plano mediano, a mucosa e a luz são vistos em uma única fileira de cortes transversais (Figura 10).

Figura 9 - Vista do plano mediano da UMT

Legenda: Camada muscular longitudinal externa (**ml**); camada muscular circular interna (**mc**); mucosa (**mu**). Ilustração no canto superior esquerdo representa o tipo de helicoide que forma a UMT da fotografia. Note que na luz a aparência dos cortes é de corte transversal dispostos em duas fileiras estando os cortes transversais em diagonal com a fileira contralateral. Corte sagital. MEV. Foto: Arquivo pessoal.

Figura 10 - Corte sagital distal ao plano mediano da UMT de hélice longa

Legenda: Serosa (**sr**); camada muscular longitudinal externa (**ml**); camada muscular circular interna (**mc**); luz (**L**). Ilustração no canto superior esquerdo representa o tipo de helicoide que forma a UMT da fotografia. Corte sagital. HE. Foto: Arquivo pessoal.

Existem casos em que a UMT é formada por uma helicoidal de hélice mais curta (Figura 11), e nesses casos a luz do oviduto rota encostada no eixo central da helicoidal, revelando em um corte sagital do plano mediano, a luz do oviduto em um formato ondular (Figura 12).

Figura 11 - Desenho esquemático de uma helicoidal de hélice curta.

Legenda: Tubo azul representa a helicoidal, e; eixo central (**z**). Note que a rotação ocorre em contato com o eixo central em razão do raio da hélice ser igual ou próximo de zero. Desenho: Arquivo pessoal.

Figura 12 - Corte sagital no plano mediano da junção útero-vaginal com UMT de hélice curta

Legenda - Camada muscular longitudinal externa (**ml**); camada muscular circular interna (**mc**); mucosa (**mu**). Ilustração no canto superior esquerdo representa o tipo de helicoidal que forma a UMT da fotografia. Note a luz do oviduto em helicoidal de hélice curta e o aspecto mais retilíneo na borda do órgão (setas). Corte sagital. MEV. Foto: Arquivo pessoal.

Nos casos em que a helicoidal da UMT possui uma hélice maior, isso se reflete nas camadas externas (camada muscular longitudinal e serosa) tornando a parede externa da junção útero-vaginal ondulada (Figura 13), enquanto que quando a UMT possui uma hélice menor a parede externa da junção útero-vaginal se mantém retilínea (Figura 12).

Figura 13 - Corte sagital distal ao plano mediano da junção útero-vaginal com UMT de hélice longa

Legenda: Serosa (**sr**); camada muscular longitudinal externa (**ml**); camada muscular circular interna (**mc**); mucosa (**mu**). Ilustração no canto superior esquerdo representa o tipo de helicoide que forma a UMT da fotografia. Note a luz do oviduto em helicoidal de hélice longa e o aspecto ondular na borda do órgão (setas). Corte sagital. MEV. Foto: Arquivo pessoal.

Existem fêmeas que não apresentam UMT, nessas, as camadas internas (luz do oviduto, mucosa, camada muscular circular interna) formam um tudo retilíneo (Figura 14), e não tem aspecto helicoidal.

Figura 14 - Corte sagital da junção útero-vaginal que não apresenta UMT

Legenda: Serosa (**sr**); camada muscular longitudinal externa (**ml**); camada muscular circular interna (**mc**); mucosa (**mu**). Note a luz e as bordas do oviduto em aspecto retilíneo. Corte sagital. MEV. Foto: Arquivo pessoal.

2.3.5 Variação na visibilidade da UMT

A UMT sofre variação na visibilidade de acordo com o estado que se encontra: a fresco ou fixado.

2.3.5.1 Pré-fixação (tecido a fresco)

Quando se observa o tecido a fresco a UMT na junção útero-vaginal pode ser facilmente visualizada, sendo visível mesmo através da serosa parietal (Figura 15) ou, em outras situações, visivelmente fraca (Figura 16) e só é perceptível após dissecada da serosa parietal.

Figura 15 - Fêmea apresentando UMT visível através da serosa parietal

Legenda: Vagina esquerda (**vge**); *uterine muscular twisting* (**umt**), e; setas apontam para borda da serosa parietal rompida. Note que a UMT é visível mesmo na porção onde a serosa o cobre (cabeça de seta). Foto: Arquivo pessoal.

Figura 16 - Fêmea apresentando UMT não visível devido a serosa parietal cobrir a estrutura

Legenda: Vagina esquerda (**vge**); *uterine muscular twisting* (**umt**), e; seta aponta para um ponto em que a serosa parietal está rompida. Note que a UMT não é perceptível. Foto: Arquivo pessoal.

Em alguns casos, fêmeas não apresentam UMT, nessas, a junção útero-vaginal encontra-se mais larga e com aspecto liso independente de quando observada através da serosa parietal (Figura 17) ou mesmo após dissecação da serosa parietal (Figura 18).

Figura 17 - UMT ausente, junção útero-vaginal larga e lisa vista através da serosa parietal

Legenda: Vagina direita (**vgd**); junção útero-vaginal (**juv**), e artéria hipogástrica (**ahg**). Foto: Arquivo pessoal.

Figura 18 - Junção útero-vaginal larga e lisa do mesmo espécime da figura 17, visto sem a serosa parietal.

Legenda: Vagina direita (**vgd**); junção útero-vaginal (**juv**); artéria hipogástrica (**ahg**); rim direito (**rmd**); veia porta renal (**vpr**), e; setas apontam para serosa parietal rompida. Foto: Arquivo pessoal.

2.3.5.2 Pós-fixação

Na UMT que se encontra visivelmente forte a fresco, após a fixação em formaldeído 10%, a serosa visceral e a camada muscular longitudinal externa tornam-se opacos, dificultando a visualização da estrutura (Figura 19 B), e; nos casos em que a UMT se encontra visivelmente fraca, após a fixação a serosa visceral e a camada muscular longitudinal externa, se tornam opacas e mascararam completamente a existência da UMT (Figura 19 A). Quando extraída a serosa e a camada muscular longitudinal externa, mantendo-se apenas as camadas internas que formam a UMT, o formato helicoidal permanece visivelmente forte mesmo após fixação em formaldeído (Figura 19 C).

Figura 19 - Junção útero-vaginal com UMT forte e fraca fixada em formaldeído 10%

Legenda: **A:** Segmento de vagina e UMT fraca fixada mantida com a serosa visceral e camada muscular longitudinal externa. **B:** Segmento de vagina e UMT forte fixada, mantida com serosa visceral e camada muscular longitudinal externa, e; **C:** Segmento de UMT forte do mesmo oviduto que B, removido a serosa parietal e parte da camada muscular longitudinal externa antes da fixação. Note que as camadas mais externas do oviduto se tornam opacas após fixação, dificultando a visualização da UMT em A e B. Foto: Arquivo pessoal.

2.3.6 Classificação da UMT

Com base nos nossos resultados, sugerimos uma classificação da UMT de acordo com o grau de formação/visualização (Tabela 1). Onde: *UMT Forte*, é a facilmente visualizada mesmo através da serosa parietal, tendo as camadas mais internas (mucosa e camada muscular circular interna) formadas por uma helicoide de hélice longa, refletindo isso nas camadas mais externas (camada muscular longitudinal externa e serosa) tornando-as ondular (Figura 20 A); *UMT Fraca*, a de visualização difícil só sendo visualizada sem a serosa parietal, com as camadas mais internas formadas por uma helicoide de hélice curta, e as camadas mais externas permanecendo com aspecto retilíneo (Figura 20 B), e; *UMT Ausente*, a junção útero-vaginal com todas as camadas do oviduto relaxadas e em formato retilíneo, sem apresentar qualquer grau de helicoide (Figura 20 C).

Tabela 1 - Sugestão de classificação da UMT quanto ao grau de formação (visualização)

Condição	Aparencia da Luz em Corte Sagital no Pano Mediano	Visibilidade	
		Pré-Fixação	Pós-Fixação
UMT Forte	Duas colunas de cortes transversais (helicoide de hélice longa)	Forte - visto através da serosa parietal	Fraca*
UMT Fraca	Ondular (helicoide de hélice curta)	Fraca - visto após dissecação da serosa parietal	Não visto, aspecto liso
UMT Ausente	Retilíneo (não forma helicoide)	Inexistente, aspecto liso	Inexistente, aspecto liso

*Em casos em que foi dissecado antes da fixação pode apresentar a visibilidade forte

Figura 20 - Ilustração das camadas que formam a UMT Forte, UMT Fraca e UMT Ausente

Legenda: **A:** *UMT Forte*, note que a forte contração da camada muscular circular interna resulta na formação em helicoide de hélice longa da mucosa e torna as camadas mais externas (serosa e camada muscular longitudinal externa) com aspecto ondular; **B:** *UMT Fraca*, note a camada muscular circular interna levemente contraída resultando na formação da mucosa em uma helicoide de hélice curta, sem modificar a estrutura das camadas mais externas, e; **C:** *UMT Ausente*, note a camada muscular circular interna bem relaxada, todas as camadas da junção útero-vaginal em um formato retilíneo e um maior diâmetro da mucosa. Desenho: Arquivo pessoal.

2.4 DISCUSSÃO

A UMT não é uma característica morfológica permanente no oviduto, quando presente, é formada na junção útero-vaginal, região caudal do oviduto.

A denominação *Uterine Muscular Twisting* (UMT) (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002) se deu devido à aparência retorcida da junção útero-vaginal que apresenta essa estrutura. No entanto, a junção útero-vaginal tem uma falsa aparência de *twisting*. O oviduto não rota em seu próprio eixo, evento que caracteriza uma torção (*twisting*). O que de fato não seria viável como apontado por Siegel e Sever (2006), em razão da vascularização e ligamentos do oviduto. Porém demonstramos que os ligamentos e a vascularização do oviduto não impedem a formação da UMT, isso porque, na formação da UMT não ocorre uma torção do oviduto ou mesmo da musculatura uterina. A formação ocorre apenas nas camadas internas da junção útero-vaginal. A camada muscular circular interna presente no oviduto, quando contraída, juntamente com a mucosa se dispõem em uma helicoidal, nessa região do oviduto, formando a UMT. Já a camada muscular longitudinal externa e a serosa visceral não participam do formato helicoidal.

Inferimos que a camada muscular circular interna do oviduto, na região útero-vaginal, possui as fibras musculares não em sentido circular, mas em um arranjo helicoidal, semelhante ao sugerido para o intestino por Carey (1921). Nas fibras relaxadas o arranjo helicoidal seria formado por um passo longo, mantendo o oviduto retilíneo. Quando contraídas, as fibras girariam a camada muscular circular interna que passaria a se apresentar como uma helicoide de passo curto, resultaria em uma mucosa formada por uma helicoide de hélice longa que é a UMT mais visível. As fibras da camada muscular longitudinais externas, trabalhando em conjunto, se contrairiam durante a formação da UMT. Se não houvesse a contração das fibras longitudinais o oviduto, que apresentasse UMT, teria um aspecto frouxo dentro da cavidade celomática. Em resumo, o mecanismo de formação e relaxamento da UMT, funcionária como uma mola coberta por uma capa elástica. Onde a mola (camada muscular circular interna e mucosa) e a capa elástica (camada muscular longitudinal externa e serosa visceral) completamente esticadas, seriam como o oviduto sem UMT, e quando encolhidas, o oviduto com UMT.

Observamos variação na helicoidal que forma a UMT, provavelmente em função do mecanismo de formação. Existem helicoides com hélice curta, onde a luz do órgão circunda encostada no eixo central, e isso é visto em um corte sagital na forma ondular. E existe a UMT com a hélice longa onde vemos a luz do órgão circundando longe do eixo central. No corte histológico sagital, isso é visto na forma de duas colunas paralelas formadas por vários cortes transversais da luz do órgão. E ainda existem os casos em que não há uma helicoides, e a luz da junção útero vaginal se apresenta em um formato retilíneo.

Na literatura os relatos de existência de fêmeas com UMT são bastante controversos. Ludwig e Rahn (1943) relatam a existência de uma torção na vagina (provavelmente a UMT) como uma morfologia do oviduto, sendo uma característica permanente. Nilson e Andrén (1982) referiram a estrutura como sendo temporária, e desde então, vários autores têm relatado a UMT como sendo uma estrutura sazonal (e. g. STILLE; MADSEN; NIKLASSON, 1986; ANDRÉN; NILSON, 1987; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997, 2002; YAMANOUYE et al., 2004; ALMEIDA-SANTOS, 2005; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a,b). Também em alguns casos, essa estrutura é descrita como inexistente (SIEGEL; SEVER, 2006) mesmo em espécimes antes descritas. Ainda com essas controvérsias em relação à existência de UMT, essa estrutura tem sido documentada e até mesmo sua existência sendo utilizada como carácter polimórfico (BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014b). Concordamos que a UMT seja uma estrutura sazonal, no entanto nenhum trabalho foi realizado acompanhando uma mesma fêmea para elucidar que em determinados períodos essa estrutura está presente, enquanto que em outros, ausente, no mesmo indivíduo.

Todos os relatos de existência e ausência de UMT na literatura se baseiam na observação dessa estrutura a olho nu (sem ajuda de instrumentos ópticos). Nossos resultados demonstram que a percepção da existência da UMT a olho nu é influenciável por uma série de fatores, como: presença da serosa parietal; opacificação da serosa parietal e camada muscular longitudinal externa; fixação da peça anatômica, e ainda; tamanho da hélice que forma a UMT. Deduzimos que boa parte dos relatos de fêmea sem UMT na literatura são documentados de forma equivocada, em função da influência de um ou mais desses fatores.

Até o momento, os trabalhos que realizaram cortes histológicos da UMT têm realizado apenas cortes transversais (e. g. ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997;

ALMEIDA-SANTOS, 2005; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014b). Uma estrutura em *twisting* seria perceptível em cortes transversais devido à ocorrência do estreitamento da luz do órgão em razão da torção no seu próprio eixo. Por se tratar de uma helicóide, cortes transversais do oviduto não esclarecem a existência de UMT. Cortes sagitais no plano mediano são a única maneira de se observar a UMT histologicamente.

Nenhum trabalho até então, relata a existência de graduações quanto a formação da UMT. Os trabalhos citam apenas a existência ou ausência dessa estrutura (e. g. ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997, 2002; YAMANOUYE et al., 2004; ALMEIDA-SANTOS, 2005; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a,b). Vimos que o comprimento da hélice da helicóide que forma a UMT pode variar. A UMT formada por uma helicóide de hélice longa provavelmente empurra as camadas mais externas da junção útero-vaginal, pois a UMT de hélice longa torna a parede externa ondulada, resultando em uma UMT facilmente visualizável a olho nu. Já nos casos em que a UMT é formada por uma helicóide de hélice curta, a parede externa do oviduto se mantém retilínea, o que torna mais difícil a visualização externamente dessa estrutura. A classificação da UMT em forte, fraca e ausente minimizará o conflito existente na literatura em relação à existência de UMT, facilitando a identificação dessa estrutura em futuros estudos.

A sigla UMT vem sendo amplamente utilizada por vários artigos relacionados a reprodução de serpentes (e. g. ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; YAMANOUYE et al., 2004; ALMEIDA-SANTOS, 2005; SIEGEL; SEVER 2006; ALDRIDGE et al., 2011; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a,b) por motivo histórico, mesmo se tratando de uma helicoidal ao invés de uma torção (*twisting*), sugerimos a permanência da utilização do termo UMT para nomear essa estrutura.

2.5 CONCLUSÃO

O oviduto não forma uma torção (*twisting*) quando a UMT está presente. A UMT é um tubo helicoidal formado apenas internamente, pela mucosa e camada

muscular circular interna. A camada muscular longitudinal externa e a serosa visceral não se apresentam em helicoidal.

Existem variações de UMT. Algumas fêmeas apresentam UMT fraca, onde a helicoide que forma essa estrutura tem uma hélice curta e, algumas fêmeas apresentam UMT forte, estrutura em helicoidal de hélice longa.

A fixação em formaldeído 10% torna as camadas mais externas da junção útero-vaginal mais opacas dificultando ou mesmo mascarando a existência da UMT.

O corte sagital da junção útero-vaginal é a melhor, e em alguns casos a única maneira de se constatar a UMT no oviduto.

REFERÊNCIAS

- ALDRIDGE R. D. Oviductal anatomy and seasonal sperm storage in the southeastern crowned snake (*Tantilla coronata*). **Copeia**, v. 1992, p. 1103–1106, 1992.
- ALDRIDGE, R. D.; JELLEN, B. C.; SIEGEL, D. S.; WISNIEWSKI, S. S. The sexual segment of the kidney. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Florida: CRC Press, Boca Raton, 2011. v.9, p. 477-509.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. 2005. 204 f. Tese (Doutorado em Anatomia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ORSI, A. M. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morfologia e função do oviduto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n.2, p. 109-112, 2002.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Long-term sperm storage in the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). **Japanese Journal Herpetology**, v.17, n.2, p. 46–52, 1997.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Reproduction in neotropical pitvipers, with an emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. (Ed.). **Biology of the vipers**. Utah: Eagle Mountain Publishing, 2002. p. 445–462.
- ANDRÉN, C.; NILSON, G. The copulatory plug of the adder, *Vipera berus*: a reply. **Oikos**, v. 49, p. 232-233, 1987.
- BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Is rainfall seasonality important for reproductive strategies in viviparous Neotropical pit vipers? A case study with *Bothrops leucurus* from the Brazilian Atlantic Forest. **Herpetological Journal**, v.24, p. 69-77, 2014a.
- BARROS; V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive Biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. **Advances in Zoology**, p. 01-11, 2014b.
- BARROS, V. A.; SUEIRO, L. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of phylogenetic conservatism of reproductive patterns. **Herpetological Journal**, v. 22, p. 97-104, 2012.
- BLACKBURN, D.G. Structure, function, and evolution of the oviducts of squamate reptiles, with special reference to viviparity and placentation. **Journal of Experimental Zoology**, v.282, p. 560–617, 1998.

CAREY, E. J. Studies on the structure and function of the small intestine. **The Anatomic Record**, v. 21, p. 189–216, 1921.

DYKSTRA, M. J. **A Manual of applied techniques for biological electron microscopy**. New York: Plenum Press, 257p, 1993.

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

FOX, H. The urogenital system of reptiles. In: GANS, C.; PARSONS, T. S. **Biology of the reptilia**. London: Academic Press, 1997. v. 6, p. 1-157.

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.

GUILLETTE Jr, L. J.; FOX, S. L.; PALMER, B. D. Oviductal morphology and egg shelling in the oviparous lizards *Crotaphytus collaris* and *Eumeces obsoletus*. **Journal of Morphology**, v. 201, n.2, p.145-159, 1989.

GURAYA, S. S. **Ovarian follicles in reptiles and birds**. Berlin: Springer-Verlag. 1989.

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

JONES, R. E. Ovarian cycles in non-mammalian vertebrates. In: JONES, R. E. (Ed.). **The vertebrate ovary**, New York and London: Plenum Press, 1978. p. 743–750.

JONES, S. M. Hormonal regulation of ovarian function in reptiles. In: NORRIS, D. O.; LOPEZ, K.H. (Eds). **Hormones and Reproduction of Vertebrates**. Reptiles. San Diego, CA: Academic Press, 2011. v. 3. p. 89–115.

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008. 542p.

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

NILSON, G.; ANDRÉN, C. Function of renal sex secretion and male hierarchy in the adder, *Vipera berus*, during reproduction. **Hormones and Behavior**, v. 16, p. 404-413, 1982.

PERKINS, J. M.; PALMER, B. D. Histology and functional morphology of the oviduct of an oviparous snake, *Diadophis punctatus*. **Journal of Morphology**, v. 277, p. 67-79, 1996.

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

SAINT-GIRONS, H. Sperm survival and transport in the female genital tract of reptiles. In: Hafez, E. S. E; Thibault, C. G. **The biology of spermatozoa**. Basel: S. Karger AG, 1975. p. 105–113.

SEVER, D. M.; RYAN, T. J. Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*): Part I. Evidence for oviducal sperm storage. **Journal of Morphology**, v. 241, p.1–18, 1999.

SIEGEL, D. S.; SEVER, D. M. Utero-muscular twisting and sperm storage in viperids. **Herpetological Conservation and Biology**, v. 1, n. 2, p. 87-92, 2006.

SIEGEL, 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**. Florida: CRC Press, Boca Raton, 2011. v. 9, p. 347-409.

SIEGEL, D. S.; MIRALLES, A.; TRAUTH, S. E.; ALDRIDGE, R. D. The phylogenetic distribution and morphological variation of the “pouch” in female snakes. **Acta Zoologica**, Stockholm, v. 93, n. 4, p. 1–9, 2011.

STILLE, B.; MADSEN, T.; NIKLASSON, M. Multiple paternity in the adder, *Vipera berus*. **Oikos**, v.47, p. 173-175, 1986.

TAMBOURGI, D. V.; BIZERRA, A. F.; QUEIROZ, G. P.; IBÁÑEZ, O. C. M.; SANTORO, M. L. **Manual prático sobre usos e cuidados éticos de animais de laboratório**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2010. 164 p.

URIBE, M. C.; GONZALES-PORTER, G.; PALMER, B. D.; GUILLETTE, L. J. Cyclic histological changes of the oviductal-cloacal junction in the viviparous snake *Toluca lineata*. **Journal of Morphology**, v. 237, p. 91-100, 1998.

YAMANOUYE, N.; SILVEIRA, P. F.; ABDALLA, F. M. F.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; BRENO, M. C.; SALOMÃO, M. G. Reproductive cycle of the Neotropical *Crotalus durissus terrificus*: II. Establishment and maintenance of the uterine muscular twisting, a strategy for long-term sperm storage. **General and Comparative Endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 151-157, 2004.

*Influência de fatores
endógenos e exógenos
na formação da
Alterine Muscular Existing*

3 INFLUÊNCIA DE FATORES ENDÓGENOS E EXÓGENOS NA FORMAÇÃO DA UTERINE MUSCULAR TWISTING

3.1 INTRODUÇÃO

A estocagem de espermatozoides no sistema reprodutor feminino de algumas serpentes se faz necessária uma vez que o acasalamento e a ovulação, na espécie, ocorrem em períodos distintos do ciclo reprodutivo (SCHUETT, 1992). A estocagem de espermatozoides em répteis, no interior do trato reprodutor de fêmeas, não é exclusividade das serpentes (Lagartos: ATSATT, 1953; FOX, 1963; GIST; JONES, 1987; KUMARI; SARKAR; SHIVANANDAPPA, 1990; tartarugas: GIST; JONES, 1987; HAN et al., 2008; aves: BIRKHEAD; MÜLLER, 1992). Na verdade, a estocagem de espermatozoides em fêmeas, por períodos prolongados, pode ocorrer em todos os grupos de vertebrados (HOLT; FAZELI, 2016).

O tempo de estocagem de espermatozoides no trato reprodutor feminino até a época de fertilização varia bastante entre os táxons. Em mamíferos esse tempo vai de poucas horas até vários dias, ou em caso de morcegos, até meses (BIRKHEAD; MÜLLER, 1993; HOLT; FAZELI, 2016). Já no caso dos répteis, o período de estocagem de espermatozoides nas fêmeas, pode ir de meses a anos (e. g. SAINT-GIRONS, 1975; DEVINE, 1984; GIST; JONES, 1987; SCHUETT, 1992; OLSSON; MADSEN, 1998; SEVER; HAMLETT, 2002; HOLT; LLOYD, 2010; HOLT; FAZELI, 2016).

Em serpentes são atualmente descritos dois locais de estocagem de espermatozoides, o infundíbulo e a região da junção útero-vaginal (HALPERT; GARSTKA; CREWS, 1982; GIST; JONES, 1987). Sendo o infundíbulo, uma região para estocagem de longa duração (*Long-Term Storage Sperm*) e a região da junção útero-vaginal, o local onde ocorre uma estocagem de curta duração (*Short-Term Storage Sperm*) (HALPERT; GARSTKA; CREWS, 1982).

A estocagem de espermatozoides é descrita como ocorrendo na junção útero-vaginal na forma de uma torção (*twisting*) em *Crotalus durissus terrificus* e *C. viridis viridis* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO 1997) ou enrolamento (*coiled*) em *C. viridis viridis* (LUDWIG; RAHN, 1943). Nesse local, após a cópula, ocorre a formação de um

plug fisiológico resultado de uma torção da musculatura uterina nessa região, denominada de *Uterine Muscular Twisting*, (UMT) por Almeida-Santos e Salomão (2002). A UMT inibe a passagem dos espermatozoides, tanto em direção ao infundíbulo como, de volta, em direção à vagina, mantendo esses gametas presos nessa região durante todo o período pós-cópula até o momento da ovulação (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO 1997, 2002). Há alguns autores que relatam essa estrutura como sendo um *plug* copulatório e não um local de estocagem (NILSON; ANDRÉN, 1982; ANDRÉN; NILSON, 1987).

A ovulação, que ocorre durante a primavera, aparentemente estimula o relaxamento da UMT, que persistiu durante todo o inverno, e permite que os espermatozoides estocados nessa região do útero migrem em direção ao infundíbulo para então fecundar os óvulos (LUDWIG; RAHN, 1943; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997, 2002).

Depois da denominação dessa estrutura em *Crotalus* como UMT por Almeida-Santos e Salomão (2002), outros estudos têm usado essa nomenclatura e documentado a presença de UMT como sendo o local de estocagem de espermatozoides em outras espécies de crotalíneos (e. g. ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; ALMEIDA-SANTOS, 2005; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014). Por se tratar de uma característica comum as subfamílias Crotalinae e Viperinae, a UMT parece ser uma estratégia reprodutiva ancestral dos viperídeos (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002).

A formação da UMT na junção útero-vaginal pode ser induzida pelo segmento sexual renal, após a cópula (NILSON; ANDRÉN, 1982). O segmento sexual renal é uma secreção produzida nos rins de serpentes do sexo masculino, durante a época reprodutiva, e compõem o fluido seminal (FOX, 1977) que é transferido para o sistema reprodutor feminino durante a cópula.

Apenas dois estudos se propôs estudar a UMT de um ponto de vista fisiológico. Nilson e Andrén (1982), que relatam essa estrutura uterina como sendo induzido pela presença de segmento sexual renal, e; Yamanouye et al., (2004) que sugerem que os níveis altos de estradiol e baixos de progesterona são condições fisiológicas favoráveis para a formação da UMT. Além desses hormônios esteroides, altos níveis de arginina vasotocina confere ao oviduto uma maior capacidade contrátil facilitando a formação da UMT (YAMANOUYE et al., 2004). Os níveis desses

hormônios parecem ser condições favoráveis para que o segmento sexual renal atue nos ovidutos induzindo a formação da UMT (YAMANOUYE et al., 2004).

O 17 β -estradiol (E2) geralmente é assumido como sendo o estrógeno gonadal principal nos répteis (NORRIS, 2007) e a progesterona (P4) como sendo o progestógeno principal, como em muitos outros vertebrados (CALLARD et al., 1992).

Em *Crotalus durissus* níveis plasmáticos de E2 e P4 variam sazonalmente. Os níveis de E2 encontram-se baixos na primavera (14,44 pg/mL) e verão (18,55 pg/mL) austrais. O aumento desse estrógeno se dá, nas fêmeas reprodutivas, durante o período de vitelogênese secundária (desenvolvimento folicular), com início no outono (71,63 pg/mL) época de cópula, até atingir o pico no inverno (167,40 pg/mL). Durante os períodos de gestação e pós-parto os níveis de E2 se encontram baixos. Já em relação a P4, os níveis baixos são observados durante o outono (1,60 ng/mL), e os maiores níveis plasmáticos são encontrados durante a gestação (23,80 ng/mL) que corresponde à primavera (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004).

Sabe-se que as funções dos ovidutos dos répteis são influenciadas pela ação de hormônios sexuais ovarianos (BOTTE, 1974), mas existe pouca literatura mostrando a ação específica de E2 ou P4 nos ovidutos (GIST, 2011). Estudos envolvendo receptores hormonais têm mostrado a existência de receptores E2 e P4 nos ovidutos de répteis (SALHANICK et al., 1979; KLEIS-SAN FRANCISCO; CALLARD, 1986; REESE; CALLARD, 1989; SELCER; LEAVITT, 1991; WHITTIER; WEST; BRENNER, 1991; PAOLUCCI; DIFIORE; CIARCIA, 1992; GIANNOUKOS; COHO; CALLARD, 1995; SELCER et al., 2005).

Com base na literatura trabalhamos com a hipótese de que a formação da UMT se daria exclusivamente por ação hormonal, e que os níveis séricos altos de E2 durante a estação de cópula é que seria o fator responsável pela formação dessa estrutura durante o período de cópula, e que os níveis baixos desse hormônio durante a gestação não seriam suficientes para formar essa estrutura.

3.2 MATERIAIS E METODOS

3.2.1 Animais

Utilizamos *Crotalus durissus* fêmeas adultas e juvenis do Instituto Butantan oriundas da região sudeste do Brasil. O projeto possui autorização do Ministério do Meio Ambiente (número de autorização: 37319/1) para utilização dos espécimes silvestres. A autorização foi expedida com base na Instrução Normativa nº154/2007. As serpentes permaneceram em sala com temperatura controlada (24-30°C) e fotoperíodo natural, alojadas individualmente em caixas plásticas, onde receberam água ad libitum e alimentação a cada 30 dias, antes, durante e após o delineamento experimental.

Também utilizamos dados coletados dos animais do projeto “Influências reprodutivas na biologia termal de *Crotalus durissus* neotropical (Serpentes, Viperidae) em cativeiro semiextensivo”, protocolado sob o CEUA-IB nº 1185051115, com a finalidade de minimizar a utilização de espécimes nessa pesquisa.

As fêmeas utilizadas nos experimentos foram mantidas em caixas de polipropileno individuais e receberam cuidados médicos veterinários ao longo de todo o projeto.

3.2.2 Maturidade sexual das fêmeas de *Crotalus durissus*

Para determinar o comprimento rostro-cloacal (CRC) com que as fêmeas de *Crotalus durissus* atingem a maturidade sexual, foi observado o ovário e junção útero-vaginal através de celiotomia exploratória. Foi considerado o CRC em que as fêmeas atingem a maturidade sexual o menor CRC onde se observava a totalidade de fêmeas com folículos opacos nos ovários e com UMT na junção útero-vaginal comprovado por cortes histológicos sagitais.

3.2.3 Delineamento experimental

3.2.3.1 Experimento 1: Relação da UMT com a condição reprodutiva da fêmea

Para relacionar a presença da UMT com a condição reprodutiva da fêmea realizamos celiotomias exploratória para observação da junção útero-vaginal em fêmeas de *Crotalus durissus* nas seguintes condições reprodutivas:

- IMATURAS: juvenis com CRC menor que 70 cm;
- MADURAS NÃO PRENHES: adultas com CRC maior que 73 cm, e;
- PRENHES, fêmeas com ovos, embrião ou fetos nos ovidutos.

O mesmo animal foi observado em diferentes condições reprodutivas.

3.2.3.2 Experimento 2: Relação da sazonalidade sobre a UMT

Para elucidar a sazonalidade da UMT realizamos celiotomias exploratórias ao longo de dois anos, para observação da junção útero-vaginal, em fêmeas adultas (maduras) não prenhes de *Crotalus durissus*. O oviduto de cada espécime foi observado, pelo menos, em duas datas distintas.

3.2.3.3 Experimento 3: Relação do estradiol com UMT

Para testar a hipótese de formação da UMT nas fêmeas como sendo induzida por estímulo de estradiol, submetemos fêmeas adultas não prenhes a celiotomia exploratória com o intuito de se observar a junção útero-vaginal nas seguintes situações:

- COM OVÁRIO: animais contendo as gônadas, e;
- OVARECTOMIZADAS: a partir de 90 dias após remoção das gônadas.

Coletamos uma amostra de sangue total de 2 a 3mL antes da ovariectomia e pelo menos 90 dias após para comparação dos níveis séricos de estradiol, certificando-se o sucesso da ovariectomia.

3.2.3.4 Experimento 4: Relação da progesterona com UMT

Para testar a hipótese de que a progesterona teria relação com o relaxamento da junção útero-vaginal levando ao desaparecimento da UMT, submetemos fêmeas maduras ovariectomizadas a celiotomia exploratória para observação da existência de UMT na junção útero-vaginal em dois momentos:

- ANTES P4: fêmeas que não haviam recebido aplicação exógena de progesterona, e;
- PÓS P4: fêmeas que receberam sete aplicações exógenas de 300mg de progesterona intramuscular com intervalos de 24h.

Coletamos uma amostra de sangue total de 2 a 3mL antes da aplicação de progesterona e após os sete dias de aplicação para comparação dos níveis séricos desse hormônio, certificando-se o sucesso das aplicações.

3.2.4 Dosagem hormonal

As amostras de sangue total foram centrifugadas a 1500 rpm a 25° C por 10 min e o plasma congelado a -20° C até o momento da dosagem hormonal. As dosagens foram realizadas pelo método ELIZA utilizando-se *kit* comercial “17 β -Estradiol ELIZA” e “Progesterone ELIZA” (IBL, Hamburgo, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante.

3.2.5 Classificação da UMT

Consideramos a *UMT forte* todas as vezes em que ao se acessar a cavidade celomática a estrutura era visível na região da junção útero-vaginal através da serosa parietal. Foi considerada *UMT fraca* quando ao se acessar a cavidade celomática a UMT não era visível, no entanto após abertura da serosa parietal era observado a UMT. E consideramos a *UMT ausente* quando a junção útero-vaginal se encontrava completamente lisa e retilínea, independente da abertura da serosa parietal (Dados do Capítulo 1).

3.2.6 Celiotomia

A antissepsia do campo cirúrgico foi feita com clorexidina 2%, inclusive em toda circunferência do corpo do animal entre o espaço do campo cirúrgico.

Realizamos uma incisão na margem lateral do corpo, na região onde os escudos e escamas estão em aposição, entre as duas primeiras fileiras de escamas laterais (MADER et al., 2006) na região do corpo onde se encontra a junção útero-vaginal (aproximadamente 10 cm cranialmente a abertura da cloaca).

A síntese foi feita com sutura Wolff como recomendado por Mader et al., (2006) utilizando-se fio de sutura nylon 3-0. A sutura foi removida após a cicatrização da ferida cirúrgica.

3.2.7 Protocolo anestésico

Realizamos a contenção física com auxílio de tubo de contenção e administrada a medicação pré-anestésica, sendo esta uma associação de 5mg/kg de tramadol e 0,5 mg/kg de midazolam, por via intramuscular. Depois de sedadas, contemos as serpentes manualmente e as mesmas eram intubadas com sonda endotraqueal sem balonete (*cuff*) 2 mm ou 3 mm (de acordo com o tamanho do

animal). Para segurança durante a intubação, utilizávamos um cartão de polipropileno que mantinha as presas das serpentes para trás evitando o contato desta com a mão do operador durante o procedimento. As serpentes eram mantidas em uma concentração de isoflurano de 2 a 3% de acordo com o plano anestésico em que se encontrava o animal.

Após o termino do procedimento cirúrgico o fornecimento de isoflurano era cessado e o animal continuava recebendo oxigenação manual até a recuperação total da anestesia.

3.2.8 Protocolo de eutanásia

A eutanásia dos animais foi feita com uma overdose de barbitúrico, com o fármaco tiopental em uma dose de 100 mg/kg intracelomático, seguindo as normas da Resolução nº 1000/2012-CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária). Como medida de segurança, foi feita a avaliação da efetividade do procedimento verificando a ausência de batimentos cardíacos, procedimento recomendado pelo Manual Prático sobre Usos e Cuidados Éticos de Animais de Laboratório, 1a Edição; p. 104 (TAMBOURGI et al., 2010). Após a eutanásia e coleta dos tecidos de interesse ao projeto, as carcaças dos animais foram encaminhadas para incineração no Instituto Butantan.

3.2.9 Análise estatística

Para testar as hipóteses os dados foram submetidos ao teste exato de *Fisher*, com exceção da relação dos níveis séricos de progesterona com a UMT, o qual foi submetido ao teste *U de Mann-Whitney* e a relação do estradiol com a UMT onde se utilizou o *Wilcoxon Sum Runk Test*.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Maturidade sexual das fêmeas de *Crotalus durissus*

Todas as fêmeas com CRC maior que 73 cm ($n= 35$) apresentavam folículos opacos nos ovários e UMT na junção útero-vaginal. Todas as fêmeas com CRC menor que 73cm ($n= 10$) apresentavam ovários com todos os folículos translúcidos e junção útero-vaginal sem UMT. Um espécime quando apresentava 64cm de CRC não apresentava UMT e os folículo estavam em transição de translúcidos para opacos, ao atingir 76cm foi observada UMT forte nessa fêmea.

3.3.2 Relação da condição reprodutiva com a UMT

Todas as fêmeas maduras não prenhes ($n=35$) possuíam UMT, enquanto que as fêmeas imaturas ($n=10$) apresentavam a junção útero-vaginal com aspecto liso (*Teste exato de Fisher*, $n= 45$; $p < 0,0001$) (Gráfico 1 e figura 21). Em relação as fêmeas adultas maduras ($n=43$) apenas as fêmeas durante o período em que estavam prenhes ($n=8$) não apresentaram UMT (*Teste exato de Fisher*, $n=43$; $p < 0,0001$) (Gráfico 1 e Figuras 22).

Gráfico 1 - Relação da UMT com o status reprodutivo da fêmea

Legenda: Barra preta representa fêmeas com UMT; barra com linhas diagonais representa fêmeas sem UMT, e; número no topo da barra representa o tamanho da amostra.

Figura 21 - Junção útero-vaginal de *Crotalus* imatura

Legenda: Junção útero-vaginal (**juv**), e; vagina esquerda (**vge**). Foto: Arquivo pessoal.

Figura 22 - Junção útero-vaginal de *Crotalus* prenhe

Legenda: Junção útero-vaginal (**juv**), e; vagina direita (**vgd**). Foto: Arquivo pessoal.

3.3.3 Relação da ovulação com a UMT

Uma fêmea em ovulação foi observada com a presença de alguns folículos recém ovulados (ovos) no oviduto e com a UMT em grau forte (Figura 23).

Figura 23 - Oviduto de fêmea de *Crotalus durissus* durante o processo de ovulação

Legenda: Oviduto (**ovt**); vagina (**vg**), e; ovo no oviduto (**ov**). Seta aponta para a região útero-vaginal apresentando UMT forte. Note que o espécime apresenta UMT forte e os ovos repletos por vitelo identificando a ovulação recente. Foto: Arquivo pessoal.

3.3.4 Relação da sazonalidade com a UMT

As fêmeas maduras não prenhes apresentaram UMT ao longo de todo o ano. Essa estrutura encontrava-se mais forte durante as estações de outono e inverno austrais, enquanto que ao longo da primavera e o verão austrais essa estrutura se encontra fraca (*Teste exato de Fisher*, $n = 40$; $p = 0,0104$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Relação da UMT de fêmeas *Crotalus durissus* com a sazonalidade (austral)

Legenda: Porção preta da barra representa fêmeas com UMT forte; porção cinza da barra representa fêmeas com UMT fraca, e; número no topo da barra representa o tamanho da amostra.

3.3.5 Relação do estradiol com a UMT

Os níveis séricos de estradiol nas fêmeas maduras de *Crotalus durissus* não influenciam a formação de UMT. Fêmeas maduras não prenhes com ovário e níveis séricos de estradiol acima de 10 pg/mL apresentavam UMT, quando ovariectomizadas passaram a ter níveis séricos de estradiol abaixo de 10pg/mL, e ainda assim continuaram apresentando UMT no oviduto ($Z = 4,245E-314$; $n=20$; $p = 1,000$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Relação da UMT de fêmeas *Crotalus durissus* com o ovário

Legenda: Porção preta da barra representa fêmeas com UMT; porção com linhas na diagonal da barra representa fêmeas sem UMT, e; número no topo da barra representa o tamanho da amostra.

3.3.6 Relação da progesterona com a UMT

Fêmeas ovariectomizadas que apresentam UMT forte exibem níveis séricos de progesterona mais baixos do que as fêmeas que apresentam UMT fraca ($n = 8$; $U' = 16.000$; $p = 0,0286$) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Relação dos níveis séricos de progesterona com o grau de formação da UMT em fêmeas *Crotalus durissus* com o ovário

Legenda: Barra preta representa UMT forte; barra cinza representa UMT fraca; eixo central representa o desvio padrão, e; número no topo do eixo representa o tamanho da amostra.

Após aplicação exógena de progesterona, metade das fêmeas ovariectomizadas que apresentavam UMT, passaram a apresentar um aspecto liso da junção útero-vaginal (ausência de UMT) (*Teste exato de Fisher*; $n=20$; $p = 0.0325$) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Relação da UMT de fêmeas *Crotalus durissus* ovariectomizadas com administração exógena de progesterona

Legenda: Porção preta da barra representa fêmeas com UMT; porção com linhas na diagonal da barra representa fêmeas sem UMT, e; número no topo da barra representa o tamanho da amostra.

Todas as fêmeas em que houve relaxamento da junção útero-vaginal e passaram a não apresentar UMT pertenciam ao grupo de fêmeas em que se aplicou a P4 (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Relação da aplicação exógena de progesterona com a existência da UMT em *Crotalus durissus* ovariectomizadas

Legenda: Porção branca da barra representa as fêmeas antes da aplicação de P4; porção cinza quadriculada da barra representa fêmeas após a aplicação de P4, e; número no topo da barra representa o tamanho da amostra.

As fêmeas que mesmo após a aplicação de progesterona continuaram apresentando UMT são fêmeas que apresentavam UMT forte e após a aplicação de P4 passaram a apresentar UMT fraca (*Teste exato de Fisher*; $n = 5$; $p = 0.0079$), enquanto que as fêmeas que apresentavam UMT fraca após a aplicação de progesterona passaram a ter a junção útero-vaginal completamente lisa (*Teste exato de Fisher*; $n = 5$; $p = 0,0079$) (Figura 24).

Figura 24 - Esquema representando o tipo de UMT antes e depois da aplicação exógena de progesterona

Legenda: As cinco fêmeas com UMT forte após a aplicação de progesterona passaram a apresentar UMT fraca. As cinco fêmeas com UMT fraca após a aplicação de progesterona passaram a apresentar UMT ausente. Fonte: Arquivo pessoal.

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Maturidade sexual das fêmeas de *Crotalus durissus*

Ainda que os outros autores relatem a existência da UMT apenas no período que compreende o tempo pós-cópula até a ovulação (NILSON; ANDRÉN, 1982; STILLE; MADSEN; NIKLASSON, 1986; ANDRÉN; NILSON, 1987; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997, 2002; ALMEIDA-SANTOS, 2005; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012), nossos resultados demonstram que em animais *in vivo* a

UMT encontra-se em todas as estações do ano. Apenas fêmeas imaturas não apresentam UMT.

O único dado que existe na literatura a respeito de tamanho de maturidade sexual de *Crotalus durissus* da região Sudeste do Brasil é para os machos (e. g. SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2002), para as fêmeas, existe apenas referência da população do Nordeste, onde essas fêmeas atingem a maturidade a partir de 83 cm de CRC (BARROS; SUERO; ALMEIDA-SANTOS, 2012). As fêmeas oriundas da região sudeste acompanhadas *in vivo* por nós, apresentaram-se com UMT, comprovado com cortes histológico sagitais (de acordo com dados do 1º Capítulo) e folículos opacos, portanto, maduras, com CRC a partir de 73 cm. Esses resultados demonstram que a UMT é uma ótima característica para analisar a maturidade sexual de espécies que apresentam essa estrutura.

3.4.2 Relação da sazonalidade e condição reprodutiva com a UMT

Embora todas as fêmeas maduras apresentem UMT, esta não é uma estrutura permanente como descrito por Ludwig e Rahn (1943). As fêmeas maduras apresentam UMT, porém, quando estão prenhes, deixam de apresentar essa estrutura. E em seguida, no intervalo de quarenta dias após a parturição, a UMT se forma novamente no oviduto da fêmea.

A UMT é claramente visível (UMT forte) na maioria das fêmeas (70%) durante o período reprodutivo da espécie. Já durante a primavera e o verão apenas 25% das fêmeas apresentam a junção útero-vaginal com UMT forte. Inferimos que essa menor proporção de fêmeas com UMT forte fora da época reprodutiva tenha sido alguns dos casos de observação de UMT, fora do período reprodutivo, considerados não naturais por Yamanouye et al. (2004). Nós não entendemos que se trata de casos não naturais, uma vez que o restante das fêmeas, na verdade, não deixa de apresentar UMT, apenas possuem a estrutura com um grau de visibilidade menor (UMT fraca).

Deduzimos que o equívoco na literatura ocorre onde há afirmação da ausência da UMT fora da época reprodutiva. E provavelmente isso tem ocorrido devido ao grau de visibilidade dessa estrutura. A visibilidade da UMT está relacionada ao tipo de helicoide (hélice longa ou curta) que forma essa estrutura (Dados do

capítulo 1) e, nossos resultados mostram que essa variação no tipo de helicoide se apresenta sazonalmente. Dados do capítulo 1 comprovam que em espécimes fixados a visualização da UMT torna-se difícil, tornando uma UMT fraca imperceptível quando visto externamente a olho nu. Uma solução para observação da UMT fraca em espécimes fixados seria a realização de análises de cortes histológicos sagitais, os quais permitem a visualização da helicoide nas camadas mais internas da junção útero-vaginal (Dados do Capítulo 1).

Yamanouye et al., (2004) relacionam a existência da UMT com o estado reprodutivo da fêmea, afirmando que a frequência de fêmeas em vitelogênese secundária com UMT é maior do que a de fêmeas em vitelogênese primária. Já Barros, Rojas e Almeida-Santos (2012) afirmam não terem encontrado fêmeas com a UMT nas estações de primavera e verão, período em que as fêmeas apresentam vitelogênese primária. Inferimos que esses relatos de presença da UMT sejam na realidade UMT forte. Nós trabalhamos com espécimes ovariectomizadas e observamos que as gônadas ou o processo de vitelogênese não apresentam qualquer tipo de influência sobre a forma da UMT, fêmeas ovariectomizadas continuam apresentando UMT. No entanto, essa relação observada por Yamanouye et al., (2004) existe na realidade de uma forma indireta. Durante o outono e inverno encontram-se fêmeas em vitelogênese secundária, e o período que compreende essas duas estações é também o período em que observamos o maior número de UMT forte. O que demonstra que, embora ocorram sazonalmente no mesmo período, esses dois eventos são independentes. Provavelmente fatores ambientais sazonais que influenciam a reprodução como o fotoperiodismo, a temperatura e a umidade, estejam relacionados indiretamente ao grau de formação da UMT, assim como à vitelogênese.

3.4.3 Relação do estradiol com a UMT

O E2 está diretamente relacionado a mudanças histológicas no oviduto das serpentes, sendo provavelmente o hormônio ovariano mais importante relacionado ao desenvolvimento uterino (MEAD; EROSHENKO; HIGHFILL, 1981). Este hormônio também é sugerido por Yamanouye et al., (2004) como sendo um dos moduladores responsáveis pela formação e existência da UMT, esses autores sugerem que níveis

altos de estradiol e baixos de progesterona são condições necessárias para que durante a cópula o segmento sexual renal, estimule a formação da UMT. Embora pareça obvio que o E2 seja o principal modulador fisiológico responsável pelo grau de formação da UMT (forte, fraca ou ausente), *in vivo* demostramos que o estradiol não tem qualquer relação com o grau de formação ou existência da UMT. Tanto as fêmeas que apresentavam UMT fraca como as que apresentavam UMT forte, após ovariectomizadas, com níveis basais de estradiol, não apresentaram mudanças na estrutura da UMT, continuaram apresentando UMT fraca e forte respectivamente.

Aqui mostramos que os níveis séricos de estradiol não têm nenhuma relação com a formação ou mesmo tipo de helicóide da UMT (hélice longa ou curta), no entanto, deduzimos que como a UMT não é observada nas fêmeas imaturas, só estando presente em fêmeas adultas, pode ser que tratar-se de uma característica sexual secundária e que o aumento dos hormônios sexuais na puberdade esteja relacionado ao aparecimento da UMT nas fêmeas.

3.4.4 Relação do sêmen com a UMT

Embora alguns autores atribuam ao segmento sexual renal a função de estímulo para formação da UMT (NILSON; ANDRÉN, 1982; STILLE; MADSEN; NIKLASSON, 1986; ANDRÉN; NILSON, 1987; YAMANOUYE et al., 2004), nossos resultados sugerem que o segmento sexual renal não tem influência na formação dessa estrutura, pois nossas fêmeas não foram inseminadas e apresentavam UMT. E ainda, fêmeas que apresentavam a UMT fraca passaram a apresentar essa estrutura forte quando observada em outro momento, sem terem tido qualquer contato com sêmen. Aqui também demonstramos que uma fêmea virgem, nascida em cativeiro e mantida individualmente, apresentou UMT forte quando adulta. Portanto, o sêmen ou qualquer componente desse não se faz necessário para a formação ou existência da UMT fraca ou forte.

A UMT tem sido relacionada a presença de espermatozoides na junção útero-vaginal e, portanto, como sendo um local de estocagem de gametas masculinos no trato reprodutivo da fêmea (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997, 2002; ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; ALMEIDA-SANTOS, 2005; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-

SANTOS, 2012; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a,b). Duas variáveis podem estar correlacionadas estatisticamente sem que uma seja a causa da outra, e sim por estarem ligadas a uma terceira variável. Isso, muitas vezes, é alvo de interpretações equivocadas (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978). Provavelmente seja o que observamos na literatura em relação à UMT e a presença de espermatozoides. A “época reprodutiva” (sazonalidade) é a terceira variável correlacionada à “UMT forte” e a “presença de espermatozoide” nessa estrutura. Nossos resultados demonstram que não existe um efeito causa consequência entre as variáveis “UMT” e “presença de espermatozoide”. A UMT existe independente da presença de espermatozoides no oviduto das fêmeas.

3.4.5 Relação da progesterona com a UMT

Embora Mead, Eroshenko e Highfill (1981) demonstrem que diferente do estradiol a progesterona não causa nenhum efeito a nível histológico do oviduto, é sabido, que a nível fisiológico a progesterona age no miométrio, diminuindo a contratilidade (CALLARD; HIRSCH, 1976; CALLARD; ABRAMS-MOTZ, 1985). Nosso estudo mostra que a P4 tem uma ação no oviduto de *Crotalus durissus* levando ao relaxamento da musculatura lisa da junção útero-vaginal e consequentemente resultando na ausência da UMT. Ainda que alguns autores levantam a hipótese de que a ovulação seria o estímulo para o relaxamento da UMT (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997, 2002), mostramos que na verdade os níveis altos de P4 é que estão relacionados com esse mecanismo. O processo de ovulação da fêmea não tem relação com o relaxamento da UMT. Aqui mostramos que um animal com folículos recém ovulados apresenta a UMT forte. Também demonstramos fêmeas ovariectomizadas, logo, sem folículos que após aplicação exógena de P4 deixaram de apresentar UMT.

Os níveis de P4 são baixos no início da gestação e aumentam progressivamente até atingir os maiores níveis no segundo terço da gestação (CHAN; ZIEGEL; CALLARD, 1973; HIGHFILL; MEAD, 1975), o que pode explicar o motivo da fêmea com folículos recém ovulados ainda apresentar UMT. Provavelmente a medida em que a gestação avance e os corpos lúteos já estejam completamente formados

secretando P4, os níveis séricos desse hormônio aumentem e a UMT relaxe levando a ausência dessa estrutura nas fêmeas prenhes. O que justifica, também, o relato de torção em fêmeas em início de gestação observados por Nilson e Andrén (1982).

Sabe-se que, como em outros vertebrados, as concentrações dos receptores hormonais podem alterar de acordo com a fase do ciclo (KLEIS-SAN FRANCISCO; CALLARD, 1986; SUMIDA et al., 2001; PAOLUCCI; Di CRISTO, 2002). O número de receptores de P4 é dependente dos níveis séricos de E2. Níveis altos de E2 levam ao aumento do número de receptores de P4. Consequentemente quando os níveis de P4 aumentam reduz os níveis de E2 que por sua vez leva a uma queda nos níveis dos próprios receptores de P4 (KLEIS-SAN FRANCISCO; CALLARD, 1986). Em nosso estudo, injetamos P4 nas fêmeas no período em que se encontra as fêmeas prenhes na natureza (primavera e verão austrais), no entanto trabalhamos com fêmeas ovariectomizadas o que pode ter resultado em uma queda no número de receptores de P4 influenciando ao não relaxamento da UMT em alguns espécimes. Além disso, apenas hormônios livres no plasma são capazes de acessar os receptores nas células alvo, e assim como nos outros vertebrados, os répteis possuem circulando na corrente sanguínea as proteínas ligadoras dos hormônios sexuais (SHBPs). Essas proteínas se ligam aos hormônios sexuais regulando a quantidade de hormônio livre no plasma e consequentemente regulam o acesso dos hormônios às células alvo (CALLARD, I.; CALLARD, G., 1987). As variações anuais na concentração plasmática de SHBPs podem ter uma importante relação na regulação da disponibilidade dos esteroides ovarianos com os seus tecidos alvo (JONES, 2011).

O relaxamento da UMT (UMT ausente) está relacionado aos níveis séricos de P4, porém, a densidade de receptores de P4 no miométrio e a concentração plasmática de SHBPs, provavelmente influenciam a ação da P4 na UMT. Como *Crotalus durissus* apresenta uma reprodução sazonal e bianual (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002) deduzimos que essa sazonalidade tenha influência na densidade de receptores de hormônios sexuais bem como na concentração plasmática de SHBPs, fatores que podem justificar os espécimes que mesmo após aplicação exógena de P4 não relaxam a UMT.

3.4.6 Ausência e presença de UMT

É bem provável que a ausência da UMT em fêmeas prenhes seja um mecanismo necessário para a passagem dos fetos durante o parto. Portanto, nas espécies que apresentam UMT, possivelmente a P4 tem um papel importante no relaxamento da junção útero-vaginal aumentando a luz do oviduto e transformando essa porção do oviduto em um canal retilíneo para permitir a passagem dos fetos. Por outro lado, a função da existência da UMT fraca em fêmeas adultas não prenhes, e de UMT forte, principalmente em fêmeas em período reprodutivo, permanece sendo uma incógnita. A função da UMT pode estar relacionada a uma forma de defesa contra infecções ascendentes. Principalmente por essa estrutura ser mais desenvolvida durante a época de cópula onde o provável risco de infecções é maior devido a penetração do hemipênis nas vaginas.

Outra provável função da formação da UMT seria a de aumentar a área da junção útero-vaginal, aumentando assim, a capacidade de receber um maior volume de sêmen durante o período de cópula. Já que, o formato helicoidal da UMT (Dados do capítulo I) pode conferir um aumento na área da luz do oviduto em relação a um segmento retilíneo que ocupe o mesmo espaço. Esse mecanismo de formação em helicoide para aumento de área é visto em outros animais. Alguns peixes elasmobrânquios possuem um intestino curto, porém em espiral, e essa conformação resulta em um aumento da área de absorção do órgão (e. g. McVICAR, 1979). O aumento da área para recebimento de sêmen na UMT favoreceria a competição espermática nesse local.

Embora a existência da UMT tem sido bastante relatada na literatura, se conhece muito pouco, de fato, sobre a fisiologia dessa estrutura. E ainda que, até então, a maioria dos autores tenham relacionado a UMT a estocagem de espermatozoides, nossos resultados revelam que mais estudos necessitam ser realizados para se atribuir de fato esta função à UMT.

3.5 CONCLUSÃO

Fêmeas de *Crotalus durissus* atingem a maturidade sexual com CRC acima de 73 cm.

A UMT não está presente nas fêmeas imaturas, e é uma estrutura observada em todas as fêmeas sexualmente maduras com exceção de espécimes prenhes a partir do segundo terço de gestação.

A UMT é uma característica ideal para diferenciar fêmeas imaturas de fêmeas sexualmente maduras, com comprimento rostro-cloacal próximas ao tamanho de maturidade.

A UMT fraca é uma estrutura presente durante todo o período do ano. Nas estações de outono e inverno (época reprodutiva da fêmea) a maioria das fêmeas apresentam UMT forte.

Os níveis séricos de estradiol endógeno baixos não alteram morfologicamente a formação da UMT.

A ovulação não altera a conformação da UMT.

Progesterona exógena é capaz de modificar a conformação da UMT desfazendo por completo essa condição uterina nas fêmeas quando aplicado durante a primavera austral (período de gestação da espécie).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. 2005. 204 f. Tese (Doutorado em Anatomia) – 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**, v.139, p. 143–150, 2004.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ORSI, A. M. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morfologia e função do oviduto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n.2, p. 109-112, 2002.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Long-term sperm storage in the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). **Japanese Journal Herpetology**. v.17, n.2, p. 46–52, 1997.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Reproduction in neotropical pitvipers, with an emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. (Ed). **Biology of the vipers**. Utah: Eagle Mountain Publishing, 2002. p. 445–462.
- ANDRÉN, C.; NILSON, G. The copulatory plug of the adder, *Vipera berus*: a reply. **Oikos**, v. 49, p. 232-233, 1987.
- ATSATT, S. R. Storage of sperm in the female chameleon *Microsaura pumila pumila*. **Copeia**, v. 59, 1953.
- BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Is rainfall seasonality important for reproductive strategies in viviparous Neotropical pit vipers? A case study with *Bothrops leucurus* from the Brazilian Atlantic Forest. **Herpetological Journal**, v.24, p. 69-77, 2014a.
- BARROS; V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive Biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. **Advances in Zoology**, p. 01-11, 2014b.
- BARROS, V. A.; SUEIRO, L. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of phylogenetic conservatism of reproductive patterns. **Herpetological Journal**, v. 22, p. 97-104, 2012.
- BIRKHEAD, T. R.; MÜLLER, A. P. **Sperm competition in birds: evolutionary causes and consequences**. London: Academic Press, 1992.

BIRKHEAD, T. R.; MÜLLER, A. P. Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds, and mammals. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 50, p. 295-311, 1993.

BOTTE, V. The hormonal control of the oviduct in the lizard *Lacerta sicula* Raf. 1. The effects of ovariectomy and steroid replacement. **Monitore Zoologico Italiano**, v.8, p. 48-54, 1974.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building**. New York: Wiley, 1978.

CALLARD, I. P.; ABRAMS-MOTZ, V. Hormonal regulation of myometrial activity in the turtle, *Chrysemys pitta*. **American Zoologist**, v. 25, p. 647, 1985.

CALLARD, I.; CALLARD, G. Sex steroid receptors and non-receptor proteins. In: NORRIS, D. O.; JONES, R. E. **Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles**. New York: Plenum Press 1987. p. 355-384.

CALLARD, I. P.; FILETI, L.; PEREZ, L.; SORBERA, L.; GIANNOUKOS, G.; KLOSTERMAN, L.; TSANG, P.; MCCRAKEN, P. Role of the corpus luteum and progesterone in the evolution of vertebrate viviparity. **American Zoologist**, v. 32, n. 2, p. 264-275, 1992.

CALLARD, I. P.; HIRSCH, M. The influence of oestradiol-17 β and progesterone on the contractility of the oviduct of the turtle, *Chrysemys picta*, *in vitro*. **Journal of Endocrinology**, v. 68, p. 147-152, 1976.

CHAN, W. C.; ZIEGEL, S.; CALLARD, I. P. Plasma progesterone in snakes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 44, p. 631-637, 1973.

DEVINE, M.C. Potential for sperm competition in reptiles: behavioral and physiological consequences. In: SMITH, R. L. **Sperm competition and the evolution of animal mating systems**. New York: Academic Press, 1984. p. 509-521.

FOX, W. Special tubules for sperm storage in female lizards. **Nature**, v. 198, p. 500-501, 1963.

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

GIANNOUKOS, G.; COHO, D. W.; CALLARD, I. P. Turtle oviduct progesterone receptor: radioligand and immunocytochemical studies of changes during the seasonal cycle. **Endocrine**, v. 3, p. 429-437, 1995.

GIST, D.H. Hormones and the sex ducts and sex accessory structures of reptiles. In: NORRIS, D.O.; LOPEZ, K.H. **Hormones and reproduction of vertebrates**. Reptiles. San Diego, CA: Academic Press, 2011. v. 3, p. 117-139.

GIST, D.; JONES, J. M. Storage of sperm in the reptilian oviduct. **Scanning Microscopic**, v. 1, p. 1839-1849. 1987.

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

HAN, X.; ZHANGLI, L.; LI, M.; BAO, H.; HEI, N.; CHEN, Q. Ultrastructure of anterior uterus of the oviduct and the stored sperm in female soft-shelled turtle, *Trionyx sinensis*. **The Anatomic Record**, v. 291, p. 335–351, 2008.

HIGHFILL, D. R.; MEAD, R. A. Sources and levels of progesterone during pregnancy in the garter snake, *Thamnophis elegans*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 27, p. 389–400, 1975.

HOLT, W. V.; FAZELI, A. Sperm Storage in the Female Reproductive Tract. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 15, n. 4, p. 291-310, 2016.

HOLT, W.V; LLOYD, R.E. Sperm storage in the vertebrate female reproductive tract: how does it work so well. **Theriogenology**, v. 73, p. 713–722, 2010.

JONES, S. M. Hormonal regulation of ovarian function in reptiles. In: NORRIS, D.O.; LOPEZ, K.H. (Eds). **Hormones and reproduction of vertebrates**. Reptiles. San Diego, CA: Academic Press, 2011. v.3, p. 89–115.

KLEIS-SAN FRANCISCO, S. K.; CALLARD, I. P. Progesterone receptors in the oviduct of a viviparous snake (*Nerodia*): correlations with ovarian function and plasma steroid levels. **General and Comparative Endocrinology**, v. 63, p. 220–229, 1986.

KUMARI, T. R. S.; SARKAR, H. B. D.; SHIVANANDAPPA, T. Histology and histochemistry of the oviductal sperm pockets of agamid lizard *Calotes versicolor*. **Journal of Morphology**, v. 203, p. 97-106, 1990.

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

MADER, D. R.; BENNETT, R. A.; FUNK, R. S.; FITZGRALD, K. T.; VERA, R.; HERNANDES-DIVERS, S. J. Surgery. In: MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery**. 2.ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006.p. 581–630.

McVICAR, A. H. The distribution of cestodes within the spiral intestine of *Raja naevus* Muller & Henle. **Journal of Parasitology**, v. 9, p. 165–176, 1979.

MEAD, R. A.; EROSHENKO, V. P.; HIGHFILL, D. R. Effects of progesterone and estrogen on the histology of the oviduct of the garter snake, *Thamnophis elegans*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 45, p. 345–354. 1981

NILSON, G.; ANDRÉN, C. Function of renal sex secretion and male hierarchy in the adder, *Vipera berus*, during reproduction. **Hormones and Behavior**, v. 16, p. 404-413, 1982.

NORRIS, D. O. **Vertebrate endocrinology**. San Diego; London: Academic Press, 2007.

OLSSON M; MADSEN T. Sexual selection and sperm competition in reptiles. In: BIRKHEAD T. R.; MOLLER A. P. **Sperm competition and sexual selection**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 503–564.

PAOLUCCI, M.; DI CRISTO, C. Progesterone receptor in the liver and oviduct of the lizard *Podarcis sicula*. **Life Sciences**, v. 71, p. 1417–1427, 2002.

PAOLUCCI, M.; DIFIORE, M. M.; CIARCIA, G. Oviduct 17 β -estradiol receptor in the female lizard, *Podarcis s. sicula*, during the sexual cycle: relation to plasma 17 β -estradiol concentration and its binding proteins. **Zoological Science**, v. 9, p. 1025–1035. 1992.

REESE, J. C.; CALLARD, I. P. Two progesterone receptors in the oviduct of the freshwater turtle *Chrysemys picta*: possible homology to mammalian and avian progesterone receptor systems. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 33, p. 297–310. 1989.

SAINT-GIRONS, H. Sperm survival and transport in the female genital tract of reptiles. In: Hafez, E. S. E; Thibault, C. G. **The biology of spermatzoa**. Basel: S. Karger AG, 1975. p. 105–113.

SALHANICK, A. R.; VITO, C. C.; FOX, T. O.; CALLARD, I. P. Estrogen-binding proteins in the oviduct of the turtle, *Chrysemys picta*: evidence for a receptor species. **Endocrinology**, v. 105, p. 1388– 1395, 1979.

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

SELCER, K. W.; LEAVITT, W. W. Progesterone downregulates progesterone receptor, but not estrogen receptor, in the estrogen-primed oviduct of a turtle (*Trachemys scripta*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 83, p. 316–323, 1991.

SELCER, K. W; SMITH, S. G.; CLEMENS, J. W.; PALMER, B. D. Androgen receptor in the oviduct of the turtle, *Trachemys scripta*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 141, p. 61–70, 2005.

SEVER, D. M; HAMLETT, W. C. Female sperm storage in reptiles. **Journal of Experimental Zoology**, v. 292, p.187–199, 2002.

SUMIDA, K.; OOE, N.; SAITO, K.; KANEKO, H. Molecular cloning and characterisation of reptilian estrogen receptor cDNAs. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 183, p. 33–39, 2001.

STILLE, B.; MADSEN, T.; NIKLASSON, M. Multiple paternity in the adder, *Vipera berus*. **Oikos**, v. 47, p. 173-175, 1986.

TAMBOURGI, D. V.; BIZERRA, A. F.; QUEIROZ, G. P.; IBAÑEZ, O. C. M.; SANTORO, M. L. **Manual prático sobre usos e cuidados éticos de animais de laboratório**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2010. 164 p.

WHITTIER, J. M.; WEST, N. B.; BRENNER, R. M. Immunorecognition of estrogen receptors by monoclonal antibody H222 in reproductive tissues of the red sided gartersnake. **General and Comparative Endocrinology**, v. 81, p. 1–6, 1991.

YAMANOUYE, N.; SILVEIRA, P. F.; ABDALLA, F. M. F.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; BRENO, M. C.; SALOMÃO, M. G. Reproductive cycle of the Neotropical *Crotalus durissus terrificus*: II. Establishment and maintenance of the uterine muscular twisting, a strategy for long-term sperm storage. **General and Comparative Endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 151-157, 2004.

Conclusão

4 CONCLUSÃO

A UMT possui uma falsa aparência de *twisting*, no entanto, é um tubo helicoidal formado apenas internamente. A melhor maneira de identificar essa estrutura é através de um corte sagital no plano mediano da junção útero-vaginal. É uma estrutura ontogenética só aparecendo na fase adulta das fêmeas, apenas fêmeas sexualmente maduras possuem UMT. Durante a época reprodutiva a UMT é mais forte, sendo formado por uma helicoide de hélice longa. Fêmeas ovariectomizadas apresentando níveis basais de estradiol continuam apresentando UMT na junção útero-vaginal. A ovulação não é capaz de relaxar a UMT, no entanto fêmeas prenhes a partir do segundo terço de gestação não apresentam UMT. Níveis altos de progesterona sérica são capazes de relaxar a UMT.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. 2005. 204 f. Tese (Doutorado em Anatomia) – 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**, v.139, p. 143–150, 2004.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ORSI, A. M. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morfologia e função do oviduto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n.2, p. 109-112, 2002.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Long-term sperm storage in the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). **Japanese Journal Herpetology**, v. 17, n. 2, p. 46–52, 1997.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Reproduction in neotropical pitvipers, with an emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. (Eds.). **Biology of the vipers**. Utah: Eagle Mountain Publishing, 2002. p. 445–462.
- BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Is rainfall seasonality important for reproductive strategies in viviparous Neotropical pit vipers? A case study with *Bothrops leucurus* from the Brazilian Atlantic Forest. **Herpetological Journal**, v. 24, p. 69-77, 2014a.
- BARROS; V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive Biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. **Advances in Zoology**, v. 2014, p. 01-11, 2014b.
- BARROS, V. A.; SUEIRO, L. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of phylogenetic conservatism of reproductive patterns. **Herpetological Journal**, v. 22, p. 97-104, 2012.
- HO, S. M. Vitellogenesis. In: PANG, P.; SCHREIBMAN, M. (Eds.), **Vertebrate endocrinology: fundamentals and biochemical implications**. New York: Academic Press. 1991. vol. 4. Part A, p. 91–126
- LUDWIG, M.; RAHN, H. Sperm storage and copulatory adjustment in the prairie rattlesnake. **Copeia**, v. 1943, p. 15-18, 1943.

NILSON, G.; ANDRÉN, C. Function of renal sex secretion and male hierarchy in the adder, *Vipera berus*, during reproduction. **Hormones and Behavior**, v. 16, p. 404-413, 1982.

SALOMÃO, M. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. The reproductive cycle in male neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. (Ed). **Biology the vipers**. Carmel, Indiana: Eagle Mountain, 2002.

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

STILLE, B.; MADSEN, T.; NIKLASSON, M. Multiple paternity in the adder, *Vipera berus*. **Oikos**, v.47, p. 173-175, 1986.

es naturais da
Twisting

a da
Twisting

Impler
enrolage

farmações/Utterme muer
Twisting