CLAUDIO AUGUSTO ROJAS

Padrões de estocagem de esperma e variações cíclicas
ovidutais em serpentes Xenodontinae

São Paulo
2013

CLAUDIO AUGUSTO ROJAS

**Padrões de estocagem de espermatozoides e variações cíclicas
ovidutais em serpentes Xenodontinae**

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

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

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

São Paulo
2013

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2842
FMVZ

Rojas, Claudio Augusto
Padrões de estocagem de esperma e variações cíclicas ovidutais em serpentes Xenodontinae /
Claudio Augusto Rojas. -- 2013.
173 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2013.

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. Xenodontinae. 2. Estocagem de esperma. 3. Ciclo reprodutivo. 4. Ciclo ovidutal. 5. Ultraestrutura.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Padrões de estocagem de esperma e variações cíclicas em serpentes Xenodontinae", protocolado sob o nº 2793/2012, utilizando 271 (duzentos e setenta e um) serpentes, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Selma Maria Almeida Santos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/2012.

We certify that the Research "Sperm storage patterns and oviductal cyclical variation in Xenodontinae snakes", protocol number 2793/2012, utilizing 271 (two hundred, seventy one) snakes, under the responsibility Profa. Dra. Selma Maria Almeida Santos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/2012.

São Paulo, 9 de novembro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

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
cenaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Padrões de estocagem de esperma e variações cíclicas ovidutais em serpentes Xenodontinae", protocolo n° 668/09, sob a responsabilidade de Selma Maria Almeida Santos e Cláudio Augusto Rojas - 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 n° 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 8/8/12.

We certify that the research entitled "Sperm storage patterns and oviductal cyclical variations in Xenodontinae snakes", protocol number 668/09, under the responsibility of Selma Maria Almeida Santos and Cláudio Augusto Rojas - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research - is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 8/8/12.

Vigência do Projeto:	N° de animais/espécie	ADITIVO/OBSERVAÇÃO
11/2009 - 05/2013 Laboratório Especial de Ecologia e Evolução	32 serpentes <i>Oxyrhopus galiei</i> (F); 32 serpentes <i>Philodryas paraguayensis</i> (F); 32 serpentes <i>Tamodon dorsatus</i> (F); 32 serpentes <i>Helicops modestus</i> (F); 32 serpentes <i>Liophis mullaris</i> (F)	Alteração de vigência

São Paulo, 9 de agosto de 2012.

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ROJAS, Claudio Augusto

Título: Padrões de estocagem de esperma e variações cíclicas ovidutais em serpentes
Xenodontinae

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

A minha companheira e amiga Márcia, pelo carinho sempre dado, aos meus irmãos Juan Carlos e Julio, primos e tios na Argentina, aos meus tios Julio e Susana e primos, que me acolheram no Brasil, ao meu pai falecido, a todos eles dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Selma Maria de Almeida Santos, pela orientação, confiança e amizade.

A coordenadora do programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Profa. Dra Maria Angélica Miglino pela oportunidade de realizar o presente estudo

Ao CNPQ pelo apoio financeiro no desenvolvimento do presente estudo.

Aos Prof. Dr. Carlos Jared e a Profa. Dra Marta Antoniazzi, por gentilmente terem liberado o uso de matérias e equipamentos no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

A Profa. Dra Sylvia Mendes Carneiro do Instituto Butantan pelo ensino e ajuda na realização da microscopia eletrônica de transmissão.

A Verônica Alberto Barros pelo auxílio na confecção dos mapas de distribuição de espécimes, climatogramas, revisão de texto e pela grande amizade.

A Prof. Dra. Rose Eli Grassi Ricci pelo ensino e ajuda na confecção e leitura do material processado pela microscopia eletrônica de varredura.

A Simone Jared pela ajuda na confecção e leitura do material pela microscopia eletrônica de transmissão e pela grande amizade.

Ao Ronaldo do Laboratório de Anatomia Microscópica e do Desenvolvimento da Faculdade de Veterinária e Zootecnia, pela ajuda e ensino no processamento do material histológico.

A curadora Glaucia Maria Funk Pontes da coleção herpetológica do Museu de Ciência e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica (MCT-PUC) do Rio Grande do Sul.

A Fátima Queiroz Alves da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC – BA) pelo empréstimo de exemplares.

Ao curador Argolo do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC-BA).

A curadora Rejane Lira do Museu de Zoologia da Universidade Federal da Bahia (MZ-UFBA).

A Silvia Cardozo, Danusa e Patricia do Laboratório de Herpetologia, pelo fornecimento de animais utilizados no estudo.

Aos pesquisadores, funcionários, pós-graduandos e estagiários do Laboratório de Ecologia e Evolução, Biologia Celular e Herpetologia do Instituto Butantan.

RESUMO

ROJAS, C. A. **Padrões de estocagem de esperma e variações cíclicas ovidutais em serpentes Xenodontinae**. [Sperm storage patterns and oviductal cyclical variation in Xenodontinae snakes]. 2013. 173f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Os padrões de estocagem de esperma e as variações morfológicas cíclicas do trato reprodutivo feminino constituem táticas reprodutivas muito pouco estudadas em serpentes neotropicais, se comparadas às serpentes de regiões temperadas. Assim, o presente estudo teve por objetivo caracterizar e compreender as estratégias reprodutivas empregadas por fêmeas de quatro espécies de serpentes brasileiras da subfamília Xenodontinae. Amostras de gônadas e vias genitais foram coletadas em diferentes estações do ano e relacionadas aos estágios reprodutivos da fêmea. Os resultados indicaram que as serpentes estudadas possuem dois locais de estocagem de esperma distribuídos no infundíbulo posterior e na junção útero-vaginal. *Liophis miliaris*, *Oxyrhopus guibei* e *Philodryas patagoniensis* apresentaram estocagem por meio de glândulas túbulo-alveolares ramificadas e glândulas tubulares ciliadas no infundíbulo posterior. Das quatro espécies estudadas, apenas *Tomodon dorsatus* e *P. patagoniensis* apresentaram grupos de espermatozóides armazenados nos sulcos da junção útero-vaginal. No entanto, unicamente *P. patagoniensis* parece ter a capacidade de produzir várias ninhadas com esperma estocado proveniente dessa região. Em ambos os locais de estocagem as células secretoras aumentaram a produção de carboidratos neutros na presença de esperma, o que sugere um processo de nutrição. Em fêmeas vitelogênicas o aumento da atividade secretora do epitélio ovidutal com produção de vacúolos eletrodensos parece estar sobre controle hormonal. Durante o ciclo reprodutivo as glândulas uterinas de espécies ovíparas e vivíparas também mostraram um aumento da secreção em fêmeas vitelogênicas. No entanto, as glândulas uterinas das espécies ovíparas apresentaram uma maior atividade do retículo endoplasmático rugoso, o que indicou produção de proteínas para formação da membrana da casca. O ciclo reprodutivo e a época de acasalamento variaram entre as populações das diferentes espécies. Em *L. miliaris*, *O. guibei* e *P. patagoniensis* essas variações estiveram ligadas a mudanças na temperatura e pluviosidade, já *T. dorsatus* não apresentou variações no ciclo reprodutivo, provavelmente influenciada pela inércia filogenética.

Palavras-chave: Xenodontinae. Estocagem de esperma. Ciclo reprodutivo. Ciclo ovidutal. Ultraestrutura.

ABSTRACT

ROJAS, C. A. **Sperm storage patterns and oviductal cyclical variation in Xenodontinae snakes** [Padrões de estocagem de esperma e variações cíclicas ovidutais em serpentes Xenodontinae]. 2013. 173f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Sperm storage patterns and cyclic morphological variations in the female reproductive tract are poorly studied reproductive tactics in Neotropical snakes if a comparison to snakes from temperate regions is established. Therefore, the aim of this study is to characterize and understand the female reproductive strategies of four species of Xenodontinae snakes from Brazil. Samples of the gonads and genital ducts were collected during the different seasons of the year and a correlation with female reproductive stages was established. Results show that these snakes have two sperm storage sites in the posterior infundibulum and uterovaginal junction. *Liophis miliaris*, *Oxyrhopus guibei* and *Philodryas patagoniensis* store sperm by means of branched tubuloalveolar glands and tubular ciliated glands in the posterior infundibulum. Only *Tomodon dorsatus* and *P. patagoniensis* showed sperm stored in the furrows of the uterovaginal junction. Anyway, only *P. patagoniensis* seems to be capable of producing multiple clutches using sperm stored in this portion. Secretory cells increased the production of neutral carbohydrates in the presence of sperm in both sperm storage sites, which suggests the existence of a nutrition process. In vitellogenic females, the increase of the secretory activity in the oviductal epithelium with production of eletrodense vacuoles seems to be under hormonal control. During the reproductive cycle, uterine glands of oviparous and viviparous species also showed an increase in secretion in vitellogenic females. However, uterine glands of oviparous species showed more intense activity of the rough endoplasmic reticulum, which indicates the production of proteins for the formation of the egg shell. Reproductive cycles and timing of mating varied between different populations. In *L. miliaris*, *O. guibei* and *P. patagoniensis*, these variations were linked to the changes in temperature and rainfall patterns, but *T. dorsatus* did not show any variation in the reproductive cycles between populations, probably influenced by phylogenetic inertia.

Keywords: Xenodontinae, Sperm Storage, Reproductive Cycles, Oviductal Cycle, Ultrastructure.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB – Alcian Blue

Abr - Azul de Bromofenol

A/F - Azul de Toluidina/Fucsina

AG – Aparelho de Golgi

ANCOVA – Análise de covariância

ANOVA – Análise de variância

CRC – Comprimento rostro-cloacal

H/E – Hematoxilina/Eosina

JUV – Junção útero-vaginal

KCL – Cloreto de potássio

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

ML – Microscopia de luz

PAS - Ácido Periódico de Schiff

RE – Receptáculos de esperma

REL – Retículo endoplasmático liso

RER - Retículo endoplasmático rugoso

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Espécies investigadas no presente estudo.....	30
Figura 2	– Procedência dos espécimes estudados e sua distribuição nos biomas brasileiros	32
Figura 3	– Localidade de coleta das serpentes estudadas e sua distribuição nos diferentes biomas.....	33
Figura 4	– Padrões climáticos dos municípios da região Sul estudada.....	35
Figura 5	– Climatogramas das localidades estudadas na região Sudeste do Brasil.....	36
Figura 6	– Padrões climáticos dos municípios estudados da região Nordeste.....	37
Figura 7	– Fotomicrografias de corte transversal de oviduto de <i>Sibynomorphus mikanii</i> usadas para exemplificar os locais que foram medidos nas espécies estudadas.....	42
Figura 8	– Aparelho reprodutor feminino das quatro espécies estudadas.....	48
Figura 9	– Trato reprodutor feminino de <i>Tomodon dorsatus</i> e <i>Oxyrhopus guibei</i>	49
Figura 10	– Secções transversais do infundíbulo de <i>Oxyrhopus guibei</i> e <i>Tomodon dorsatus</i>	55
Figura 11	– Fotomicrografias do infundíbulo posterior de <i>Philodryas patagoniensis</i> e <i>Oxyrhopus guibei</i>	56
Figura 12	– Fotomicrografias do infundíbulo posterior das quatro espécies investigadas.....	57
Figura 13	– Infundíbulo posterior com receptáculos de esperma em <i>Liophis miliaris</i>	58
Figura 14	– Secções transversais do infundíbulo posterior de <i>Oxyrhopus guibei</i>	59
Figura 15	– Fotomicrografia do infundíbulo posterior em <i>Philodryas patagoniensis</i> e <i>Tomodon dorsatus</i>	60
Figura 16	– Cortes transversais do infundíbulo posterior corados por diferentes métodos histoquímicos.....	61
Figura 17	– Cortes transversais do infundíbulo posterior corados por diferentes métodos histoquímicos.....	62

Figura 18	–	Secções transversais de útero de <i>Philodryas patagoniensis</i> e <i>Liophis miliaris</i>	63
Figura 19	–	Corte histológico e ultraestrutura do útero em <i>Oxyrhopus guibei</i> , <i>Philodryas patagoniensis</i> e <i>Liophis miliaris</i>	64
Figura 20	–	Cortes transversais de útero corados por diferentes métodos histoquímicos.....	65
Figura 21	–	Cortes transversais do útero de diferentes espécies	66
Figura 22	–	Secções transversais da junção útero-vaginal (JUV) em <i>Liophis miliaris</i> e <i>Philodryas patagoniensis</i>	67
Figura 23	–	Ultraestrutura e corte histológico da junção útero-vaginal em <i>Liophis miliaris</i> , <i>Tomodon dorsatus</i> e <i>Oxyrhopus guibei</i>	68
Figura 24	–	Secções transversais da junção útero-vaginal de <i>Tomodon dorsatus</i> , <i>Oxyrhopus guibei</i> e <i>Philodryas patagoniensis</i> corados pelo Tricrômico de Mallory e Picrosirius	69
Figura 25	–	Cortes transversais da junção útero-vaginal de <i>Tomodon dorsatus</i> e <i>Philodryas patagoniensis</i> com reação positiva para Alcian Blue e Ácido Periódico Schiff	70
Figura 26	–	Fotomicrografia de corte histológico e ultraestrutura da vagina de <i>Tomodon dorsatus</i> , <i>Oxyrhopus guibei</i> e <i>Liophis miliaris</i>	71
Figura 27	–	Secções transversais da vagina de <i>Tomodon dorsatus</i> e <i>Philodryas patagoniensis</i> coradas pelo Tricrômico de Mallory e Picrosirius.....	72
Figura 28	–	Cortes histológicos e ultraestrutura do epitélio vaginal e da cloaca, em <i>Tomodon dorsatus</i> , <i>Liophis miliaris</i> e <i>Oxyrhopus guibei</i>	73
Figura 29	–	Variação sazonal do diâmetro do maior folículo ovariano e ovos em fêmeas de <i>Liophis miliaris</i> da região Sul do Brasil.....	74
Figura 30	–	Variação sazonal do diâmetro do maior folículo ovariano e ovos em fêmeas de <i>Liophis miliaris</i> da região Sudeste do Brasil.....	77
Figura 31	–	Ultraestrutura do epitélio infundibular e das glândulas tubulares infundibulares ciliadas de <i>Liophis miliaris</i>	81
Figura 32	–	Microscopia eletrônica de transmissão da junção útero-vaginal de <i>Liophis miliaris</i>	82
Figura 33	–	Microscopia eletrônica de varredura da vagina de <i>Liophis miliaris</i>	83

Figura 34	–	Ciclo folicular, presença de ovos e estocagem de esperma em <i>Liophis miliaris</i> no Nordeste do Brasil.....	84
Figura 35	–	Ciclo folicular e estocagem de esperma de <i>Oxyrhopus guibei</i> do Sul do Brasil	87
Figura 36	–	Ciclo folicular e estocagem de esperma de <i>Oxyrhopus guibei</i> do Sudeste do Brasil	89
Figura 37	–	Ultraestrutura do epitélio infundíbular de <i>Oxyrhopus guibei</i> com células secretoras e ciliadas	93
Figura 38	–	Ultraestrutura das glândulas tubulares infundibulares e do útero em <i>Oxyrhopus guibei</i>	94
Figura 39	–	Microscopia eletrônica de transmissão da junção útero-vaginal e vagina em <i>Oxyrhopus guibei</i>	95
Figura 40	–	Ciclo folicular de <i>Oxyrhopus guibei</i> do Nordeste do Brasil	96
Figura 41	–	Ciclo folicular de <i>Philodryas patagoniensis</i> do Sul do Brasil	99
Figura 42	–	Ciclo folicular e estocagem de esperma em <i>Philodryas patagoniensis</i> do Sudeste do Brasil.....	102
Figura 43	–	Ultraestrutura do epitélio infundíbular de <i>Philodryas patagoniensis</i> durante o ciclo reprodutivo.....	106
Figura 44	–	Microscopia eletrônica de transmissão do útero e junção útero-vaginal de <i>Philodryas patagoniensis</i>	107
Figura 45	–	Ultraestrutura do epitélio da junção útero-vaginal e vagina em <i>Philodryas patagoniensis</i>	108
Figura 46	–	Variação sazonal do diâmetro do maior folículo ovariano, embriões e estocagem de esperma em <i>Tomodon dorsatus</i> da região Sul do Brasil	110
Figura 47	–	Variação sazonal do diâmetro do maior folículo ovariano, embriões e época de cópula em <i>Tomodon dorsatus</i> da região Sudeste do Brasil	113
Figura 48	–	Ultraestrutura do epitélio infundíbular em <i>Tomodon dorsatus</i> durante o ciclo reprodutivo.....	117
Figura 49	–	Ultraestrutura do epitélio e glândulas uterinas em <i>Tomodon dorsatus</i> em diferentes estágios reprodutivos.....	118

Figura 50 – Microscopia eletrônica de transmissão da junção útero-vaginal e vagina em <i>Tomodon dorsatus</i>	119
---	-----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	–	Variações microscópicas do oviduto em fêmeas de <i>Liophis miliaris</i> da região Sul do Brasil.....	75
Quadro 2	–	Variações microscópicas estruturais do oviduto em fêmeas de <i>Liophis miliaris</i> da região Sudeste do Brasil.....	78
Quadro 3	–	Padrão de variações microscópicas ovidutais em fêmeas de <i>Liophis miliaris</i> da região Nordeste do Brasil.....	85
Quadro 4	–	Variações microscópicas estruturais do oviduto em fêmeas de <i>Oxyrhopus guibei</i> da região Sul do Brasil	88
Quadro 5	–	Variações microscópicas estruturais do oviduto em fêmeas de <i>Oxyrhopus guibei</i> da região Sudeste do Brasil	90
Quadro 6	–	Variações microscópicas estruturais do oviduto em fêmeas de <i>Oxyrhopus guibei</i> da região Nordeste do Brasil	97
Quadro 7	–	Morfometria microscópica do oviduto em fêmeas de <i>Philodryas patagoniensis</i> da região Sul do Brasil	100
Quadro 8	–	Morfometria microscópica do oviduto em fêmeas de <i>Philodryas patagoniensis</i> da região Sudeste do Brasil.....	103
Quadro 9	–	Morfometria microscópica do oviduto de <i>Tomodon dorsatus</i> da região Sul do Brasil	111
Quadro 10	–	Morfometria microscópica do oviduto de <i>Tomodon dorsatus</i> do Sudeste do Brasil	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Informações básicas dos ciclos reprodutivos, distribuição geográfica e padrão de atividade das espécies estudadas.....	26
Tabela 2	–	Número e procedência de exemplares analisados neste estudo.....	31
Tabela 3	–	Variação sazonal da secreção ovidutal de <i>Liophis miliaris</i> da região Sul do Brasil.....	76
Tabela 4	–	Mudanças na secreção ovidutal de <i>Liophis miliaris</i> do Sudeste do Brasil	79
Tabela 5	–	Mudanças na secreção ovidutal de <i>Liophis miliaris</i> do Nordeste do Brasil	86
Tabela 6	–	Padrão da secreção ovidutal em <i>Oxyrhopus guibei</i> do Sul do Brasil	87
Tabela 7	–	Análises histoquímicas do oviduto de <i>Oxyrhopus guibei</i> do Sudeste do Brasil	91
Tabela 8	–	Análises histoquímicas do oviduto de <i>Oxyrhopus guibei</i> do Nordeste do Brasil	98
Tabela 9	–	Padrão de secreção do oviduto de <i>Philodryas patagoniensis</i> do Sul do Brasil	99
Tabela 10	–	Padrão de secreção do oviduto de <i>Philodryas patagoniensis</i> do Sudeste do Brasil	102
Tabela 11	–	Padrão de secreção do oviduto de <i>Tomodon dorsatus</i> do Sul do Brasil.....	110
Tabela 12	–	Atividade secretora do oviduto de <i>Tomodon dorsatus</i> do Sudeste do Brasil.....	113

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 OBJETIVOS.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 ESCOLHA DAS ESPÉCIES.....	30
3.2 COLETA DE DADOS.....	31
3.2.1 Tamanhos e procedências das amostras.....	31
3.2.2 Coleta das amostras.....	38
3.3 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ (ML).....	38
3.3.1 Métodos de coloração.....	39
3.3.2 Fotomicrografias.....	40
3.3.3 Morfometria.....	40
3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	43
3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	43
3.5.1 Cortes semifinos.....	44
3.5.2 Cortes ultrafinos.....	44
3.5.3 Contrastação positiva para cortes ultrafinos.....	45
3.6 FORMA DE ANÁLISES DOS RESULTADOS.....	45
3.6.1 Análise dos aspectos reprodutivos.....	45
3.6.2 Análise morfológica e histológica.....	46
3.6.3 Análise ultraestrutural.....	46
4 RESULTADOS.....	47
4.1 ANATOMIA MACRO E MICROSCÓPICA.....	47
4.2 CICLO REPRODUTIVO DE <i>LIOPHIS MILIARIS</i>	74
4.2.1 Região Sul.....	74
4.2.2 Região Sudeste.....	76
4.2.2.1 Ultraestrutura do Ciclo Ovidutal.....	79

4.2.3 Região Nordeste.....	84
4.3 CICLO REPRODUTIVO DE <i>OXYRHOPUS GUIBEI</i>	86
4.3.1 Região Sul.....	86
4.3.2 Região Sudeste.....	89
4.3.2.1 Ultraestrutura do Ciclo Ovidutal.....	91
4.3.3 Região Nordeste.....	96
4.4 CICLO REPRODUTIVO DE <i>PHILODRYAS PATAGONIENSIS</i>	98
4.4.1 Região Sul.....	98
4.4.2 Região Sudeste.....	101
4.4.2.1 Ultraestrutura do Ciclo Ovidutal.....	104
4.5 CICLO REPRODUTIVO DE <i>TOMODON DORSATUS</i>	109
4.5.1 Região Sul.....	109
4.5.2 Região Sudeste.....	112
4.5.2.1 Ultraestrutura do Ciclo Ovidutal.....	115
4.6 RESULTADOS GERAIS.....	120
4.6.1 Anatomia ovidutal.....	120
4.6.2 Ciclo ovidutal.....	120
4.6.3 Estocagem de esperma.....	121
4.6.4 Ciclos reprodutivos.....	122
5 DISCUSSÃO.....	123
5.1 ANATOMIA MACRO E MICROSCÓPICA DO OVIDUTO.....	123
5.2 ESTOCAGEM DE ESPERMA.....	131
5.3 CICLO REPRODUTIVO E VARIAÇÃO INTERPOPULACIONAL.....	136
5.3.1 <i>Liophis miliaris</i> (cobra da água).....	136

5.3.2 <i>Oxyrhopus guibei</i> (falsa coral)	139
5.3.3 <i>Philodryas patagoniensis</i> (parelheira)	141
5.3.4 <i>Tomodon dorsatus</i> (cobra espada)	142
5.4 CICLO OVIDUTAL	143
5.4.1 <i>Liophis miliaris</i> (cobra da água)	143
5.4.2 <i>Oxyrhopus guibei</i> (falsa coral)	147
5.4.3 <i>Philodryas patagoniensis</i> (parelheira)	150
5.4.4 <i>Tomodon dorsatus</i> (cobra espada)	151
6 CONCLUSÃO	154
REFERÊNCIAS	155
APÊNDICES	166

1 INTRODUÇÃO

O oviduto reptiliano é uma estrutura com múltiplas funções as quais refletem uma ampla gama de padrões reprodutivos nos diversos grupos estudados até hoje (GIRLING, 2002). Tal estrutura pode agir como via ou canal para o ovo durante o processo de ovulação e oviposição ou parturição. Também provê o ovo com albúmen, minerais e fibras protéicas durante a formação da casca (GIRLING, 2002). Em espécies vivíparas o oviduto pode interagir com as membranas extra-embrionárias na troca de gases, água e transferência de nutrientes entre a mãe e o feto (BLACKBURN, 1998). Ele também funciona como local de fertilização e, em algumas espécies, como local de estocagem de gametas masculinos. No entanto, o conhecimento das funções do trato reprodutor feminino nos répteis ainda é mínimo, se comparado a outros grupos de vertebrados, principalmente os mamíferos eutérios.

Em répteis, a terminologia utilizada na identificação das diversas regiões ovidutais e de suas funções é controversa até hoje. De maneira geral, essa divisão se inicia anteriormente com: **(a)** infundíbulo, **(b)** tuba uterina (região glandular, porção secretora de albúmen e magno), **(c)** istmo (segmento aglandular, região intermediária), **(d)** útero (região responsável pela formação da casca do ovo, gravidez ou gestação) e **(e)** vagina ou diverticulum de Giacomini (GIRLING, 2002; SIEGEL et al., 2011). Essas regiões não são reconhecidas em todas as espécies de répteis e outras podem ser incluídas (GIRLING, 2002). Em várias descrições do oviduto de Squamata (serpentes, lagartos e anfisbenas), o infundíbulo e o útero são divididos em porção anterior e posterior (GUILLETTE et al., 1989; BLACKBURN, 1998; ALMEIDA-SANTOS, ORSI, 2002; ROJAS, 2009). Recentemente alguns autores propõem a divisão do útero de serpente em porção glandular (glândulas uterinas) e porção aglandular (ausência de glândulas uterinas). Além, de caracterizar a região da tuba uterina como infundíbulo posterior por não existir uma homologia entre essas estruturas (SIEGEL et al., 2011).

Trabalhos relacionados à anatomia macroscópica e microscópica do trato reprodutor feminino de Squamata foram realizados a partir do século dezenove (SACCHI, 1888; GIACOMINI, 1893). Dentro dos Squamata, as primeiras espécies de serpentes estudadas incluem quatro colubrídeos e um viperídeo encontrados na Europa: *Coronella austriaca* (GIACOMINI, 1893), *Dolicophis jugularis* (SACCHI, 1888; GIACOMINI, 1893), *Elaphe quatorlineata*

(GIACOMINI, 1893), *Natrix natrix* (GIACOMINI, 1893; GIERBERG, 1922) e *Vipera aspis* (GIACOMINI, 1893). Posteriormente foram estudadas serpentes das famílias Colubridae, Dipsadidae, Elapidae, Viperidae, Leptotyphlopidae, Natricidae, Typhlopidae e Viperidae. As serpentes dessas famílias são provenientes da Ásia, África, e América do Norte (TAKEWAKI; HATTA, 1941; KASTURIRANGAN, 1951a; FOX, 1956; SAINT-GIRONS, 1957; FOX; DESSAUER, 1962; HOFFMAN; WIMSATT, 1972; BAUMAN; METTER, 1977; HALPERT et al., 1982; ALDRIDGE, 1992; PERKINS; PALMER, 1996).

A primeira grande revisão sobre morfologia e função do oviduto em Squamata foi realizada pelo Blackburn (1998), a qual incluiu informação histológica de 21 espécies de serpentes de oito famílias diferentes (BLACKBURN, 1998). Já no ano 2002, ocorreu a segunda revisão sobre a função e estrutura do oviduto, porém, focando os répteis em geral (GIRLING, 2002). Nessa revisão foram adicionados dados sobre anatomia ovidutal da serpente americana *Seminatrix pygae* (SEVER; RYAN, 1999; SEVER et al., 2000). Recentemente Siegel et al. (2011) acrescentou mais dados não incluídos nas revisões anteriores, como os descritos para *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997). Esse trabalho também incluiu dados sobre a morfologia reprodutiva de *Agkistrodon piscivorus* (SIEGEL, SEVER, 2006, 2008a,b).

Um das funções mais intrigantes do oviduto reptiliano é a estocagem de esperma, a qual pode variar de meses a anos dependendo da espécie (SEVER; HAMLETT, 2002). A capacidade das fêmeas de estocar esperma no trato reprodutivo, após a cópula, já foi descrita em muitos animais e envolve a retenção de espermatozoides viáveis por longo período de tempo (BIRKHEAD; MOLLER, 1993). Em vertebrados anamniotas, esta estratégia reprodutiva já foi descrita em peixes vivíparos e em algumas salamandras (BIRKHEAD; MOLLER, 1993). No caso dos vertebrados amniotas, a maioria dos estudos foi realizada com aves e, em menor frequência, com répteis e mamíferos (FOX, 1956; BIRKHEAD; MOLLER, 1993; ZUG, 1993).

Em répteis, a primeira descrição da estocagem de esperma foi realizada por Fox (1956), em *Thamnophis sirtalis*, serpente da família Natricidae encontrada na América do Norte. Posteriormente, foi descrita em lagartos (*Chamaeleo basiliscus*, *C. chamaleon*, *C. lateralis*, *Anolis carolinensis*, *A. sagrei*) (SAINT-GIRONS, 1962; FOX, 1963), quelônios (*Terrapene carolina*, *Sternotherus odoratus*, *Gopherus polyphemus*, *Trachemys scripta*, *Chrysemys picta*)

(HATTAN; GIST, 1975; GIST; CONGDON, 1998) e crocodilianos (*Alligator mississippiensis*) (GIST et al., 2008).

As estruturas responsáveis pela estocagem de esperma evoluíram independentemente em diferentes táxons estudados até hoje (SEVER; HAMLETT, 2002). Assim, entre os fatores que podem ter favorecido a evolução da estocagem de esperma em répteis, figuram:

(1) ocorrência de eventos reprodutivos dissociados (e.g., cópula separada da fertilização ou produção de gametas masculinos “espermatogênese” e femininos “oogênese” em diferentes épocas do ano (SAINT-GIRONS, 1975);

(2) possibilidade de nascimentos de ninhadas em estações mais favoráveis em relação à temperatura e disponibilidade de alimento (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; SCHUETT, 1992);

(3) incerteza na localização de parceiros para cópula em locais com baixa densidade de indivíduos ou no caso de espécies que se deslocam pouco numa determinada região (VOLSOE, 1944; CREWS, 1984; SCHUETT, 1992). Lagartos que ocorrem em baixas densidades e com pouca atividade, como os camaleões, apresentam maior tempo de estocagem de esperma (250 a 500 dias) que lagartos mais ativos (SAINT-GIRONS, 1962; BIRKHEAD; MOLLER, 1993);

(4) diminuição do risco de predação pela redução da frequência de acasalamento e aumento do período reprodutivo disponível para as fêmeas (BIRKHEAD; MOLLER, 1993; SCHUETT, 2002);

(5) competição espermática e múltipla paternidade em uma única ninhada (BIRKHEAD; MOLLER, 1993; OLSSON; MADSEN, 1998);

(6) possibilidade de fertilização de várias séries de folículos, independente da época do ano na qual a fêmea tenha copulado (TRYON, 1984);

(7) importância na evolução das estratégias de competição espermática e potencial de seleção sexual (SCHUETT, 1992). Segundo Tourmente et al. (2009), quanto maior o comprimento do esperma (principalmente a peça intermediária), maior é a força de propulsão dos espermatozoides e, conseqüentemente, a competição espermática e habilidade de permanecer estocado no trato reprodutor feminino.

Entre os répteis, existem algumas diferenças topográficas nos locais de estocagem de esperma no oviduto. Em quelônios e crocodilianos, foram observados dois sítios de estocagem,

um na porção posterior da região do albúmen (tuba uterina) e outro na junção útero-vaginal do oviduto (HATTAN; GIST, 1975; GIST; CONGDON, 1998; GIST et al., 2008). Dentro dos Squamata, serpentes e lagartos apresentam similaridade na localização de estruturas armazenadoras de esperma, que podem se situar no infundíbulo posterior, útero posterior e vagina (FOX, 1956; SAINT-GIRONS, 1962; FOX, 1963; SEVER; HAMLETT, 2002).

A estocagem de esperma em serpentes pode acontecer tanto no útero posterior como no infundíbulo posterior dependendo da espécie em estudo (SIEGEL et al., 2011). No primeiro caso a estocagem ocorre em sulcos profundos ou através de uma contração uterina (uterine muscular twisting) como observado em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997, 2002, 2005; BARROS et al., 2012). Já no infundíbulo posterior o armazenamento de gametas masculinos acontece em estruturas constituídas por glândulas alveolares ramificadas ou tubulares simples, que se comunicam com receptáculos seminais ou de esperma. As glândulas ramificadas possuem um epitélio secretor que varia dependendo do “status reprodutivo”, e se conecta ao lúmen por meio de um ducto comum (FOX, 1956; HOFFMAN; WIMSATT, 1972; PERKINS; PALMER, 1996; ROJAS, 2009). Alguns estudos associaram o desenvolvimento folicular à degeneração dos receptáculos seminais e também ao aumento na produção de grânulos epiteliais ricos em mucopolissacarídeos (HOFFMAN; WIMSATT, 1972; ROJAS, 2009).

De acordo com o tempo em que o esperma fica armazenado no trato reprodutor feminino, existem dois padrões de estocagem em serpentes: estocagem de esperma por longos períodos (LTSS-long-term sperm storage) e estocagem por curtos períodos (STSS-short-term sperm storage) (HOFFMAN; WIMSATT, 1972; HALPERT et al., 1982). No primeiro modelo, o esperma é estocado no terço distal do oviduto de seis a doze meses, e no segundo, na região infundibular de duas a oito semanas (HOFFMAN; WIMSATT, 1972; HALPERT et al., 1982; SCHUETT, 1992). No entanto, Eckstut et al. (2009), trabalhando com análises filogenéticas da estocagem de esperma em Squamata, mostraram o contrário. Nos clados estudados, a estocagem de esperma na região infundibular ocorreria acima de seis meses e na região da vagina até no máximo quatro meses. Booth e Schuett (2011) descreveram pela primeira vez estocagem de esperma (geneticamente confirmado) por um período de cinco anos em *Crotalus adamanteus* (cascavel da América do Norte).

Um dos aspectos controversos e pouco compreendidos do mecanismo de estocagem é a questão de sobrevivência desses gametas ao longo do tempo. Alguns autores acreditam que esses locais servem unicamente de “refúgio” físico (SEVER; RYAN, 1999; SEVER; HAMLETT, 2002), mas outros sugerem que agem como sítios de nutrição e “refúgio” químico para o esperma (FOX, 1956; HOFFMAN; WIMSSATT, 1972; HALPERT et al., 1982; ALMEIDA-SANTOS, 2005; MARINHO et al., 2009; ROJAS, 2009). Segundo Marinho et al. (2009), o aumento da atividade peptidásica no esperma estocado no útero posterior em fêmeas de *C. durissus* durante outono e inverno, influencia na sobrevivência dos gametas masculinos.

Estudos ultraestruturais em ovidutos de serpentes observaram que variações celulares são relacionadas ao desenvolvimento folicular e estocagem de esperma (HOFFMAN; WIMSSATT, 1972; PERKINS; PALMER, 1996; HEULIN et al., 2005; SIEGEL; SEVER, 2008a, b). Tais espécies apresentaram aumento na síntese de organelas (Complexo de Golgi, Retículo Endoplasmático Rugoso), presença de vacúolos apicais (altamente eletrodensos) e gotículas lipídicas no citoplasma, durante a vitelogênese secundária (GIRLING et al., 1997; SEVER; HOPKINS, 2004; SIEGEL; SEVER, 2008a, b). Esse aumento na secreção de substâncias ricas em mucopolissacarídeos, lipídeos e proteínas pelo oviduto, indicam um processo de nutrição e manutenção do esperma durante a estocagem (FOX, 1956; HOFFMAN; WIMSSATT, 1972; PERKINS; PALMER, 1996; ROJAS, 2009).

Em serpentes Viperidae, Natricidae e Dipsadidae da América do Norte já foram descritas relações interestruturais e funcionais entre o esperma e as células ovidutais. Durante o processo de estocagem, os gametas masculinos se apresentam alinhados paralelamente com suas cabeças direcionadas para o epitélio luminal e, também, imersos intra e intercelularmente (HOFFMAN; WIMSSATT, 1972; PERKINS; PALMER, 1996; SEVER; RYAN, 1999). Smith (1998), estudando mamíferos, observou que a aderência do esperma à membrana plasmática apical das células uterinas é temporária e está associada ao status de capacitação. Durante esse contato, a viabilidade do esperma é mantida e a capacitação ocorre de maneira lenta. Isso prolonga o tempo de vida do esperma e maximiza a probabilidade de concepção, quando a ejaculação não coincide com a ovulação.

Hoje, o conhecimento a respeito da estocagem de esperma em serpentes deve-se basicamente a estudos realizados na América do Norte, Ásia e Europa, com exceção de alguns trabalhos realizados na América do Sul, principalmente com viperídeos (ALMEIDA-SANTOS;

SALOMÃO, 1997, 2002, 2005; BARROS et al., 2012) e dipsadíneos (ROJAS, 2009). Entretanto, apesar da fauna de serpentes da região neotropical ser extremamente rica, pouco se conhece quanto à morfofisiologia ovidutal e evolução das estratégias reprodutivas em fêmeas.

A subfamília Xenodontinae (família Dipsadidae) constitui um grupo monofilético extremamente diversificado na América do Sul (CADLE; GREENE, 1993; VIDAL et al., 2000; ZAHER, 1999; ZAHER et al., 2009). Muitos grupos monofiléticos dentro de Xenodontinae já foram hierarquicamente bem estabelecidos em nível de tribo, como os Pseudoboini, Philodryadini, Tachymenini e Xenodontini (ZAHER, 1999; ZAHER et al., 2009).

As espécies Xenodontinae a serem investigadas apresentam diferentes modos reprodutivos e têm uma ampla distribuição no Brasil, com representantes em regiões com diversas características macroclimáticas (Tabela 1) (SAZIMA; ABE, 1991; FOWLER et al., 1998; HARTMANN; MARQUES, 2005). Estas apresentam hábitos terrestres com exceção de *Liophis miliaris* que é semi-aquática (PIZZATTO; MARQUES, 2002; BIZERRA et al., 2005; PIZZATTO; MARQUES, 2006).

Tabela 1 - Informações básicas dos ciclos reprodutivos, distribuição geográfica e padrão de atividade das espécies estudadas.

Subfamília Xenodontinae							
Tribo	Taxons	Modo reprodutivo	Distribuição geográfica no Brasil	Vitelogênese secundária	Pico de atividade	Corte ou cópula	Estocagem de esperma
Philodryadini	<i>Philodryas patagoniensis</i> (parelheira)	ovípara	Nordeste, Centro-oeste, Sul e Sudeste	sazonal (primavera-verão)	outono	não descrito	?
Pseudoboini	<i>Oxyrhopus guibei</i> (falsa coral) *	ovípara	Nordeste, Centro-oeste, Sul e Sudeste	contínuo ou assazonal	inverno-primavera	não descrito	?
Tachymenini	<i>Tomodon dorsatus</i> (corre campo)	vivípara	Sul e Sudeste	sazonal (primavera-verão)	primavera	cópula (novembro)	?
Xenodontini	<i>Liophis miliaris</i> (cobra d'água)*	ovípara	Nordeste (Sul da Bahia), Sudeste e Sul	sazonal (primavera-verão)	outono	corte sem cópula (outono)	?

Fonte: Albolea (1998); Fowler et al. (1998); Freire (1999); Passos e Fernandes (2002); Pizzatto e Marques (2002); Bizerra et al. (2005); Pizzatto e Marques (2006).

*Postura de múltiplas ninhadas em cativeiro

A maioria dos táxons (mostrados na tabela 1) apresenta ciclos reprodutivos sazonais, com pico de atividade dissociado da vitelogênese secundária ou fase folicular ativa. Isso provoca certo grau de discrepância entre essas duas variáveis e levanta a questão: porque o pico de atividade ocorre nessas estações? Segundo Marques et al. (2001), o padrão de atividade em serpentes tropicais é principalmente influenciado pelo período de acasalamento. Nesse lapso de tempo, fêmeas se encontram sexualmente receptivas e acasalam, no entanto, estas se encontram em fase folicular quiescente ou no início da vitelogênese (MARQUES et al., 2009). O esperma proveniente desse acasalamento poderia ser perdido caso a fêmea não apresentasse alguma estrutura de armazenamento. Desse modo, a estocagem de esperma é uma estratégia reprodutiva primordial na espera do momento propício para o crescimento folicular ovariano (vitelogênese) e a fertilização (Tabela 1) (SCHUETT, 1992). Esse processo caracteriza um padrão reprodutivo “dissociado”, o qual pressupõe diversas mudanças evolutivas (ALDRIDGE; DUVALL, 2002).

Em virtude das diversas linhagens evolutivas e da ampla distribuição geográfica, é compreensível que o ciclo reprodutivo dos Squamata apresente diferentes padrões ao longo do globo terrestre. Alguns autores acreditam que em áreas tropicais, os ciclos tendem a ser mais variáveis, devido à grande complexidade climática e disponibilidade de alimento (SEIGEL; FORD, 1987; SANTOS et al., 2005). Contudo, o conhecimento reprodutivo de espécies neotropicais é quase inexistente quando comparado ao das áreas temperadas, o que torna difícil sua compreensão e principalmente sua caracterização (SAINT-GIRONS, 1982; MATHIES, 2011). Serpentes de regiões temperadas se reproduzem principalmente nos períodos quentes do ano (primavera-verão) e muitas apresentam ciclos sazonais com elevada sincronização entre os indivíduos (DUVALL et al., 1982; SHINE 1985). No entanto, esse padrão reprodutivo já foi descrito também para diferentes táxons de regiões subtropicais e tropicais (MATHIES, 2011). Segundo Mathies (2011) o ciclo reprodutivo em serpentes pode ser caracterizado a nível individual e populacional. Do ponto de vista individual podem ocorrer três tipos: (a) Ciclo descontínuo, onde as gônadas e órgãos acessórios tornam-se inativos durante um período do ano; (b) ciclo contínuo, as gônadas e órgãos acessórios não apresentam uma fase de quiescência, e sim uma redução na atividade por algum período do ano e (C) acíclico, com níveis constantes de atividade durante todo o ano. Já quando o ciclo é caracterizado a nível de população, ele é classificado como sazonal (alguma sincronia dos ciclos entre indivíduos) e asazonal (assincronia cíclica entre indivíduos).

As informações (Tabela 1) relativas aos ciclos reprodutivos das espécies Xenodontinae contribuíram para a compreensão do ciclo feminino de uma forma geral. No entanto, esses trabalhos caracterizaram unicamente aspectos da ecologia reprodutiva restritos a morfometria gonadal em animais de coleção e comportamento em cativeiro (FOWLER et al., 1998; BIZERRA et al., 2005; PIZZATTO; MARQUES, 2006; PIZZATTO et al., 2008). Nenhum deles utilizou técnicas microscópicas para interpretar as variações morfológicas e estratégias reprodutivas empregadas pelas fêmeas desses táxons.

Um estudo detalhado das estratégias reprodutivas em serpentes inclui além das medidas macroscópicas, análises histológicas pela microscopia de luz (ML), histoquímica e análises ultraestruturais. A associação desses estudos permitirá observar variações morfofuncionais ovidutais durante o ciclo reprodutivo, detectar esperma no oviduto, assim como determinar a existência e distribuição de estruturas de estocagem de esperma na fêmea.

Dessa maneira, as informações reprodutivas obtidas neste estudo serão de total importância e relevância como fonte de caracteres filogenéticos, anatômicos e morfofuncionais dentro dos Squamata. A proximidade filogenética das espécies estudadas permitirá também determinar e comparar os padrões de estocagem de esperma dentro dos Xenodontinae.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é verificar a presença de estruturas de estocagem de esperma e analisar as variações cíclicas do oviduto em quatro espécies de serpentes da subfamília Xenodontinae. Para isso pretende-se:

- Descrever e comparar, por meio da anatomia macroscópica e microscópica, as diferentes regiões contidas no oviduto de serpentes ovíparas e vivíparas Xenodontinae;
- Observar a presença de esperma na região vaginal para a determinação de acasalamento recente, assim como examinar mudanças ovidutais entre as estações do ano;
- Estudar a localização, morfologia e natureza histoquímica das áreas de estocagem de esperma e suas variações entre as espécies;
- Confrontar o padrão de estocagem de esperma em populações de diferentes regiões, com características macroclimáticas distintas, a fim de avaliar se eventuais diferenças poderiam estar relacionadas a fatores externos (temperatura, pluviosidade, disponibilidade de presas);
- Analisar a inter-relação estrutural e funcional entre os espermatozóides e o epitélio dos receptáculos de esperma

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ESCOLHA DAS ESPÉCIES

As espécies a serem estudadas foram escolhidas por chegarem com bastante frequência no Instituto Butantan e, conseqüentemente, serem bem amostradas em coleções, facilitando assim, a coleta de material para análises histológicas e ultraestruturais. No entanto, o principal critério utilizado foi à relação de parentesco ou proximidade filogenética, de forma a contemplar espécies pertencentes a uma mesma subfamília, porém de tribos diferentes. As espécies Xenodontinae escolhidas incluem: *Oxyrhopus guibei* (tribo Pseudoboini), *Philodryas patagoniensis* (tribo Philodryadini), *Tomodon dorsatus* (tribo Tachymenini) e *Liophis miliaris* (tribo Xenodontini) (Figura 1).

Figura 1- Espécies investigadas no presente estudo

(A) *Oxyrhopus guibei* (falsa coral) (B) *Philodryas patagoniensis* (parelheira) (C) *Tomodon dorsatus* (cobra espada) (D) *Liophis miliaris* (cobra da água)

Fonte: Marques, O. A. V.

3.2 COLETA DE DADOS

3.2.1 Tamanhos e procedências das amostras

As amostras das quatro espécies estudadas provém de diversas localidades (Apêndices A, B, C, D) e incluem as regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil, as quais se encontram distribuídas em diferentes biomas (Figuras 2 e 3). Foram dissecados e analisados no total 126 exemplares mantidos em coleções científicas das instituições: Museu de Ciência e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica (MCT-PUC-RS), Museu de História Natural Capão da Imbuia (MNHCI-PR), Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG), Museu de Zoologia da Universidade Federal da Bahia (MZ-UFBA), Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC-BA) e Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC-BA) (Tabela 2, Apêndices E, F, G, H). Além dos espécimes pertencentes às coleções científicas foram utilizados animais provenientes da recepção de serpentes do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Um total de 70 exemplares foram eutanasiados no período de 2009 a 2012 para representação da região Sudeste do Brasil (Tabela 2, Apêndices E, F, G, H).

Tabela 2- Número e procedência de exemplares analisados neste estudo

Coleções	<i>L. miliaris</i>	<i>O. guibei</i>	<i>P. patagoniensis</i>	<i>T. dorsatus</i>	Total
MCTPUC-RS	19	3	21	21	64
MNHCI-PR	*	11	*	*	11
FUNED-MG	6	5	7	*	18
IB-SP	16	19	13	22	70
MZUFBA-BA	2	2	*	*	4
MZUESC-BA	*	9	*	*	9
CEPLAC-BA	15	5	*	*	20
Total	58	54	41	43	196

Figura 2 – Procedência dos espécimes estudados e sua distribuição nos biomas brasileiros

(A) *Liophis miliaris* (cobra da água) (B) *Oxyrhopus guibei* (falsa coral)

Fonte: DIVA-GIS 7.1.7

Figura 3 – Localidade de coleta das serpentes estudadas e sua distribuição nos diferentes biomas.

(A) *Philodryas patagoniensis* (parelheira) (B) *Tomodon dorsatus* (cobra espada)
 Fonte: DIVA-GIS 7.1.7

Para caracterizar o clima da região foram elaborados climatogramas de todos os municípios amostrados para as quatro espécies estudadas. Para isso utilizou-se o programa DIVA-GIS 7.1.7, a partir da base de dados WordClim (clima atual: 1950-2000), versão 1.3 de outubro de 2004, resolução de 10 minutos.

Nos municípios estudados da região Sul do Brasil a temperatura se caracteriza por um padrão fortemente sazonal variando de 8,4 C° a 19,5 C° nos meses mais frios do ano (junho, julho e agosto) e 17,8 C° a 28,4 C° nos meses mais quentes (janeiro, fevereiro e março). O índice de pluviosidade, entretanto, apresenta dois padrões diferentes para a região Sul. Nas localidades dos Estados de Rio Grande do Sul e Santa Catarina observam-se precipitações constantes ao longo do ano que variam de 1308 a 2051 mm³ de acordo com o município (Figura 4A). Já no Estado do Paraná as precipitações diminuem nos meses mais frios (julho e agosto), com índice pluviométrico médio de 1549 mm³ ao ano (Figura 4B).

As localidades da região Sudeste apresentam um padrão sazonal caracterizado por uma estação seca com temperaturas que variam de 9,6 C° a 21,7 C° e uma estação chuvosa com temperaturas de 17 C° a 26,9 C° (Figura 5A, B). A precipitação anual para a região varia de 910 a 2070 mm³ ao ano (Figura 5A, B).

Nos municípios da região Nordeste são detectados dois padrões relacionados ao índice de precipitação e à temperatura. Em algumas localidades da Bahia (Figura 6A) observam-se elevadas temperaturas (21 C° a 28 C°) e pluviosidade (1185 a 2102 mm³) constante ao longo do ano, enquanto em outras, existe uma estação seca e chuvosa bem marcada (Figura 6B). Nas localidades com padrão sazonal, a temperatura na estação seca varia de 13,9 C° a 25,2 C° e na estação chuvosa de 17,6 C° a 28 C° (Figura 6B). O índice de precipitação nesses municípios varia de 601 a 763 mm³ (Figura 6B).

Figura 4 - Padrões climáticos dos municípios da região Sul estudada

Figura 5 - Climatogramas das localidades estudadas na região Sudeste do Brasil

(A) Cidade de São Paulo, capital. (B) Cidade de Berilo em Minas Gerais

Fonte: WordClim 1.3

Figura 6 - Padrões climáticos dos municípios estudados da região Nordeste

(A) Sem estação seca bem definida. (B) Com estação seca definida

Fonte: WordClim 1.3

3.2.2 Coleta das amostras

As amostras coletadas dos espécimes procedentes do Instituto Butantan foram obtidas após eutanásia dos animais. A eutanásia foi realizada com 30 mg/kg de Thionembutal por via intracelomática (Ice), com posterior (20 minutos) injeção intracardíaca de 0,2 ml de Cloreto de Potássio (KCL) garantindo assim o óbito do animal (ROJAS, 2009, ROJAS et al., 2013). Em seguida à remoção do trato reprodutor feminino, os animais foram fixados em formol 10% e posteriormente preservados em álcool 70% na coleção Herpetológica do Instituto Butantan.

Dos espécimes utilizados foram anotadas as seguintes informações de cada indivíduo: 1) procedência; 2) data de coleta; 3) comprimento rostro-cloacal (CRC) e 4) comprimento do maior folículo, ovo ou embrião. Os ovidutos dos espécimes tombados em coleções herpetológicas e recém eutanasiados foram utilizados para análises histológicas e histoquímicas pela microscopia de luz (ML) (Tabela 2).

O material proveniente dos animais eutanasiados também foi processado por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), uma vez que o fixador presente nos animais de coleção (formol 10%) não é o recomendado para tais processos. No total 32 amostras foram utilizadas para tais processos, com oito amostras por espécie e duas por estação.

3.3 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ (ML)

O material coletado foi processado por parafina e historresina Leica ® no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan e no Laboratório de Anatomia Microscópica e do Desenvolvimento da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. O material incluído em historresina foi desidratado em uma série crescente de etanol de 70 a 100%, impregnado em solução A e incluído em solução B, para polimerização à temperatura ambiente dentro de cápsulas de gelatina nº 1 e nº 2.

Para inclusão em parafina, após a desidratação, as peças foram tratadas com xilol, impregnadas em parafina “overnight” e, então, incluídas em formas de papel ou barras de Leuckhart. Os blocos obtidos foram trimados e cortados a 2 μ m (historresina) e 4 μ m (parafina) de espessura, em micrótomo Microm ® HM 340 E.

3.3.1 Métodos de coloração

Os cortes foram então submetidos a colorações básicas: Azul de Toluidina/Fucsina (JUNQUEIRA, 1995), no caso de materiais incluídos em historresina, e Hematoxilina/Eosina, para aqueles incluídos em parafina. Também foi realizada a coloração do Tricrômico de Mallory para identificação de fibras colágenas e fibras musculares ou de origem epitelial, e Picrosirius para caracterizar o tipo de fibra de colágeno presente no oviduto (JUNQUEIRA et al., 1979). Os cortes histológicos corados pelo Picrosirius foram observados pela microscopia de polarização. Para facilitar a identificação de fibras nas pranchas fotográficas montadas foram colocadas do lado fotos de material corado pelo H/E.

As diversas regiões contidas no oviduto que podem apresentar secreções em determinadas fases do ciclo foram submetidas a procedimentos histoquímicos. O objetivo foi analisar a natureza de tais secreções e sua função durante o ciclo ovidutal e em caso de estocagem de esperma (nutrição, manutenção). Entre as análises histoquímicas (BANCROFT; STEVENS, 1996) figuram:

Ácido Periódico de Schiff (PAS) para a identificação e localização de carboidratos neutros (ex. glicogênio, glicoproteínas), Alcian Blue (AB) para glicosaminoglicanos carboxilados (ácidos) e Azul de Bromofenol (ABr) para proteínas.

Após coloração e montagem das lâminas, foi possível fotografar e realizar a morfometria das diferentes regiões contidas no oviduto.

3.3.2 Fotomicrografias

As fotomicrografias foram obtidas a partir de um microscópio Olympus BX51 e um estereomicroscópio Olympus SZ, utilizando o sistema fotográfico Image-Pro Express Olympus do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

3.3.3 Morfometria

A morfometria das diferentes porções ovidutais foi realizada para comparar variações histológicas entre as diferentes regiões do oviduto e para quantificar mudanças de caráter estrutural nos diferentes estágios reprodutivos. Os estágios reprodutivos foram caracterizados como pré vitelogênico ou vitelogênese primária (folículos esbranquiçados e transparentes), vitelogênico ou vitelogênese secundária (folículos amarelados com deposição de vitelo) e gravidez ou gestação. Essas medidas auxiliaram também na interpretação e compreensão do processo de estocagem (PERKINS; PALMER, 1996; HEULIN et al., 2005).

Foram tomadas 10 medidas por corte histológico das diferentes regiões ovidutais, utilizando o programa Image-Pro Express (Media Cybernetics). Os caracteres da morfologia ovidutal foram determinados de acordo com a forma e disposição das estruturas infundibulares, uterinas, presença ou ausência de glândulas, tipo de epitélio e modo de secreção. As medidas tomadas dos cortes histológicos foram realizadas em todas as porções do oviduto entre as diferentes estações e incluem (Figura 7):

- Diâmetro das glândulas tubulares infundibulares – infundíbulo posterior;
- Altura do epitélio das glândulas tubulares infundibulares - infundíbulo posterior;
- Diâmetro da glândula tubular uterina - útero;
- Diâmetro dos capilares uterinos - útero;
- Altura do epitélio ciliado- todo o oviduto;
- Altura do epitélio secretor - todo o oviduto;

Mudanças na atividade secretora do oviduto (epitelial e glandular) foram classificadas em estágios, de acordo com a positividade histoquímica dos grânulos: *I – fraca; II – moderada; III – forte*.

Figura 7 - Fotomicrografias de corte transversal de oviduto de *Sibynomorphus mikanii* (Rojas, 2009) usadas para exemplificar os locais que foram medidos nas espécies estudadas

Fonte: Rojas (2009)

AEC: altura epitélio ciliado; AES: altura do epitélio secretor; AEGTI: altura do epitélio da glândula tubular infundibular; DCU: diâmetro dos capilares uterinos; DGTI: diâmetro da glândula tubular infundibular; DGTU: diâmetro da glândula tubular uterina; L: lúmen. Toluidina-fucsina (T/F).

3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os ovidutos de espécimes recém eutanasiados foram coletados, pesados, fixados em glutaraldeído 2,5%, tampão “cacodilato de sódio” 0,1 M, pH 7,4 e processados de acordo com o protocolo que se segue:

1. Lavar em três trocas de 15 minutos cada, em tampão fosfato 0,1 M (frascos de vidro)
2. Pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão “cacodilato de sódio” 0,1 M em rotação durante 1 hora e meia (o material foi coberto com papel alumínio para evitar contato com a luz)
3. Lavar em três trocas de 15 minutos cada, em tampão fosfato 0,1 M
4. Lavar em duas trocas de 10 minutos cada, em água destilada
5. Tratamento em Ácido Tânico 1% - solução aquosa – 1h
6. Lavar em três trocas de 5 minutos cada, em água destilada
7. Desidratação em série crescente de etanol 50%, 70%*, 90% (10 minutos cada) e 100% - (quatro trocas de 10 minutos cada)
8. Montagem no suporte porta-amostra do MEV (stub) usando cola de carbono, cola de prata ou esmalte de unha
9. Recobrimento metálico com ouro por Sputtering
10. Observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Obs: * O processamento pode ser interrompido (ponto de parada).

3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Os fragmentos de oviduto de espécimes frescos foram processados e incluídos em resina epoxy Polybed, de acordo com o seguinte protocolo (BOZZOLA; RUSSEL, 1999):

1. Após fixação em solução Karnovsky, lavar em três trocas de 15 minutos cada, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2;

2. Imergir em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M em rotação durante 1 hora;
3. Lavar em três trocas de 15 minutos cada, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2;
4. Imergir em solução de acetato de uranila a 0,5% com sacarose a 13,3%, por 1 hora em temperatura ambiente;
5. Desidratar em série alcoólica crescente: 70% (2 trocas de 10 minutos cada), 95% (2 trocas de 15 minutos cada) e 100% (3 trocas de 20 minutos cada);
6. Imergir em óxido de propileno (2 trocas de 15 minutos cada);
7. Pré-inclusão em óxido de propileno + resina (1:1), em rotação durante 2 a 3 horas e depois em resina pura, "overnight", em rotação;
8. Inclusão orientada em moldes chatos em estufa a 60°C, para polimerização, por 2 a 3 dias.

3.5.1 Cortes semifinos

Após uma trimagem inicial dos blocos, para exame prévio do material ao microscópio de luz, cortes semifinos de 960 nm foram obtidos em um ultramicrotomo Sorvall MT6000, com navalha de vidro de 6 mm de espessura. Os cortes foram recolhidos em lâmina de vidro sobre uma gota de água destilada e corados a quente em azul de toluidina a 1% em solução bórax a 1%.

3.5.2 Cortes ultrafinos

Cortes ultrafinos de 60 nm foram obtidos em um ultramicrotomo Sorval MT6000, utilizando-se navalha de diamante. Os mesmos foram coletados em telas de cobre de 200 “mesh”, sem película de parlódio ou carbono.

3.5.3 Contrastação positiva para cortes ultrafinos

Para a contração em uranila, as telas contendo os cortes foram colocadas no interior de gotas de acetato de uranila a 2%, durante 15 minutos. Em seguida, as telas lavadas consecutivamente em três béqueres com água destilada.

Para a contração em chumbo, no interior de uma câmara livre de CO₂, as telas foram colocadas sobre gotas de citrato de chumbo, com os cortes voltados para baixo, durante 3 minutos. As telas, então, lavadas em água destilada, como no procedimento acima. Os cortes foram examinados em um microscópio eletrônico LEO 906E, do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

3.6 FORMA DE ANÁLISES DOS RESULTADOS

3.6.1 Análise dos aspectos reprodutivos

Fêmeas foram consideradas maduras sexualmente quando apresentarem folículos ovarianos com diâmetro maior ou igual a:

- *Tomodon dorsatus* (**6 mm**) (BIZERRA et al., 2005); *Philodryas patagoniensis* (**10 mm**)(FOWLER et al., 1998); *Oxyrhopus guibei* (**10 mm**) (PIZZATTO; MARQUES, 2002); *Liophis miliaris* (**10 mm**) (PIZZATTO; MARQUES, 2006);
- ovos/embriões nos ovidutos e vestígio de corpo-lúteo em fêmeas pós-parto (ALMEIDA-SANTOS, 2005).

Dos animais de coleção e dos eutanasiados foi analisada a distribuição ao longo do ano do tamanho dos folículos ovarianos, ovos ou embriões nos ovidutos. Os dados obtidos foram comparados visualmente com os ciclos reprodutivos já descritos anteriormente para as espécies investigadas.

3.6.2 Análise morfológica e histológica

Os dados obtidos por meio da morfometria ovidutal foram correlacionados com o CRC por meio de regressão linear simples. Das medidas levantadas, o diâmetro das glândulas tubulares infundibulares, diâmetro da glândula uterina e diâmetro dos capilares uterinos foram positivas na correlação com o CRC (covariável), assim foram testados pela análise de covariância (ANCOVA). Já a altura das glândulas tubulares infundibulares, altura do epitélio secretor e ciliado em todo o oviduto foi testada pela análise de variância (ANOVA).

As análises dos dados foram feitas de acordo com as diferentes condições reprodutivas (pré-vitelogênico, vitelogênico e gravidez ou gestação) baseadas em metodologia preconizada por Zar (1999), utilizando-se o programa Statistica 7 e Bioestat 5. Contudo, foram verificadas a normalidade e homogeneidade de variância de dados. Em todas as análises, o nível de significância alfa foi de 0,05.

3.6.3 Análise ultraestrutural

Por meio da MET foi possível observar imagens intracelulares com uma elevada definição, o que facilitou a compreensão das mudanças sazonais no epitélio, organelas, modo de secreção ovidutal (merócrina, holócrina ou apócrina) e interação entre os gametas masculinos (mudanças ultraestruturais dos espermatozóides) e o trato reprodutivo da fêmea. Já a MEV é responsável por cobrir o intervalo de informações que se situam entre a microscopia de luz e a microscopia eletrônica de transmissão (SILVEIRA, 2011). O instrumento MEV é geralmente operado na modalidade de alto vácuo, processando elétrons secundários de baixa energia, e que vão produzir imagens tri-dimensionais de grande efeito plástico, com uma notável profundidade de foco (SILVEIRA, 2011).

4 RESULTADOS

4.1 ANATOMIA MACRO E MICROSCÓPICA

O trato reprodutor feminino das espécies estudadas apresenta características anatômicas macroscópicas muito semelhantes, com algumas diferenças mínimas entre estes. Macroscopicamente, o aparelho reprodutor é constituído por dois ovidutos pareados e posicionados dentro de uma fina serosa ou pleuroperitônio visceral. O oviduto direito é mais cranial que o esquerdo nas quatro espécies sendo constituído por quatro regiões diferentes (Figura 8). A região mais caudal do trato reprodutor da fêmea é a vagina, seguida pela junção útero-vaginal, útero e infundíbulo posterior e anterior (Figura 8). A vagina é parcialmente bilobada em *T. dorsatus* e pode ser observada macroscopicamente (Figura 8D), já em *L. miliaris*, *O. guibei* e *P. patagoniensis* a mesma estrutura se encontra fundida a cloaca e não é visível a olho nu (Figura 8A, B, C). A junção útero-vaginal se caracteriza como uma região de tecido mais fino e com menor diâmetro (Figura 9A, B). O útero ocupa a maior área ovidutal como uma estrutura flácida e é responsável por abrigar os filhotes durante o período de gravidez ou gestação (Figura 8). Em *L. miliaris* o útero se apresenta pregueado independente da época do ciclo reprodutivo (Figura 8A). Nas fêmeas prenhes ou grávidas os embriões são alojados em uma série de câmaras separadas por constrições (câmaras incubatórias) e podem ser facilmente diferenciadas das demais porções ovidutais (Figura 9A, B). A porção mais cranial do trato reprodutor feminino, o infundíbulo também apresenta um formato pregueado, frequentemente translúcido, e abre-se dentro da cavidade celomática via óstio infundibular. O infundíbulo é dividido em porção anterior e posterior, com o primeiro mais translúcido que o segundo e com formato de funil (Figura 9C).

Figura 8 - Aparelho reprodutor feminino das quatro espécies estudadas

(A) *Liophis miliaris* (B) *Oxyrhopus guibei* (C) *Philodryas patagoniensis* (D) *Tomodon dorsatus*.
Ad: adrenal; CL: cloaca; IA: infundíbulo anterior; IP: infundíbulo posterior Ov: ovário; UT: útero; V: vagina.

Fonte: Rojas (2013)

Figura 9 – Trato reprodutor feminino de *Tomodon dorsatus* e *Oxyrhopus guibei*

(A) Gestação em *Tomodon dorsatus* com fetos em estágio final de desenvolvimento (B) Gravidez em *Oxyrhopus guibei*. Em ambas as serpentes pode ser observado o limite do útero em relação a junção útero-vaginal, e também as câmaras uterinas incubatórias com aumento de vascularização (seta) (C) Infundíbulo em formato de funil C: câmaras uterinas; IA: infundíbulo anterior; IP: infundíbulo posterior; UT(o): útero com ovos; UT(e): útero com embriões; JUV: junção útero-vaginal ; FO: folículos ovarianos
 Fonte: Rojas (2013)

As análises do oviduto pela microscopia de luz, MEV e MET mostraram algumas características específicas do trato reprodutor feminino. Essas características incluem topografia das estruturas responsáveis pela estocagem de esperma, tipo de fibra de colágeno no tecido conjuntivo, tipo de epitélio, camada muscular, presença de glândulas uterinas, assim como a natureza e variação sazonal de secreção. O oviduto pode ser dividido em diferentes camadas teciduais quando observado ao corte transversal. A camada mais interna ou mucosa é constituída pelo epitélio luminal e pela lâmina própria composta por tecido conectivo e glândulas. Logo abaixo da mucosa pode ser observada a camada muscular circular (interna) e longitudinal (externa), e por último a serosa encapsulando todo o oviduto (Figura 10).

As populações das quatro espécies investigadas apresentam a mesma divisão anatômica ovidutal, porém com algumas diferenças morfológicas sazonais durante o ciclo reprodutivo.

O infundíbulo é a porção mais cranial do oviduto e uma de suas funções é receber os folículos ovarianos durante a ovulação. O infundíbulo é dividido em anterior e posterior, com o primeiro caracterizado histologicamente como uma região de paredes finas com dobras irregulares (Figura 10A). O epitélio é simples cubóide constituído principalmente por células ciliadas entremeadas com células secretoras. A divisão do infundíbulo anterior para o posterior é determinada pelo surgimento de glândulas tubulares ciliadas (Figura 10B).

O infundíbulo posterior apresenta uma lâmina própria mais grossa com pregas mais profundas de aspecto tubular formando sulcos glandulares (Figuras 10B, C e 11A, B, C). As glândulas tubulares ciliadas se comunicam com o lúmen do oviduto por meio de sulcos glandulares profundos e ciliados (Figuras 10B, C e 11A, B). Essas glândulas tubulares ciliadas são observadas na parede lateral e medial dessa região (Figuras 10B, C e 11A, B,C) e apresentam células altamente ciliadas com núcleo oval a arredondado e aglomeração de mitocôndrias na porção apical da célula (Figura 12A). Cada cílio tubular se origina de um corpúsculo basal e apresenta o padrão 9 + 2 de microtúbulos (Figura 12B). Também são observados estereocílios entre os cílios das células tubulares (Figura 12B). Essas glândulas tubulares no infundíbulo podem alojar esperma, no entanto, a principal estrutura de armazenamento de gametas ocorre nos receptáculos de esperma, posicionados caudalmente às glândulas tubulares infundibulares. O epitélio que reveste internamente a região infundibular varia de simples prismático a cubóide e é constituído por células ciliadas e células não ciliadas secretoras (Figura 12C, D, E, F). O

citoplasma das células secretoras apresenta vacúolos secretores e o núcleo de ambas as células varia de alongado a irregular (Figura 12F).

Dentre as espécies estudadas foram observados receptáculos de esperma (RE) em *L. miliaris*, *O. guibei* e *P. patagoniensis*, já em *T. dorsatus* estruturas com características semelhantes aos receptáculos foram observadas, porém sem esperma (Figuras 13, 14 e 15). Os receptáculos de esperma são classificados morfológicamente como glândulas túbulo alveolares ramificadas nas quatro espécies estudadas. Entretanto, a maior ramificação de alvéolos foi observada em *L. miliaris* (Figura 13A). O limite entre os receptáculos de esperma no infundíbulo e o útero é determinado pela presença de glândulas tubulares uterinas nas quatro espécies estudadas (Figura 14A, B). Dentro dos receptáculos de esperma, grupos de espermatozóides mostraram uma conformação ou alinhamento paralelo durante a estocagem (Figuras 13, 14 e 15). O epitélio dos receptáculos é do tipo pavimentoso a cubóide dependendo da densidade espermática (Figura 14B, C). Os RE são constituídos principalmente por células secretoras e alguns tufo de células ciliadas e são circundados por células mióides, semelhante à observada em túbulos seminíferos em machos (Figura 15B, C).

Análises histoquímicas pelo Tricrômico de Mallory mostraram que o tecido conjuntivo entre os receptáculos de esperma é constituído principalmente por fibras de colágeno (Figura 16A, B). Nas serpentes estudadas as fibras de colágeno coraram em azul celeste (estruturas basófilas) e as cabeças dos espermatozóides em laranja (estruturas acidófilas) (Figura 16B). Também se observou o local exato ocupado pelas fibras de colágeno na lâmina própria do infundíbulo (Figuras 16C, D). Fibras colágenas do tipo I (laranja) foram as mais abundantes no tecido conjuntivo do infundíbulo (Figura 16D). No entanto, as glândulas tubulares (Figura 16E) apresentaram além de fibras do tipo I, fibras de colágeno do tipo III (verdes) ou reticulares (Figura 16E, F).

Análises histoquímicas na determinação da natureza da secreção produzida pelo epitélio luminal do infundíbulo mostraram que as células secretoras produzem grânulos com positividade, em maior ou menor proporção, para o Alcian Blue (mucopolissacarídeos ácidos) e para o Ácido Periódico-Schiff (PAS+) durante todo o ano (Figuras 17A, B). Isso foi observado para todas as espécies aqui estudadas, porém, se observou uma reação fraca para AB na porção apical dos receptáculos de esperma (Figura 17C). Já o PAS apresentou uma reação de positividade forte no citoplasma da célula dos receptáculos de esperma, na presença de gametas (Figuras 17D, E, F).

Nas quatro espécies estudadas o útero apresenta uma lâmina própria e uma camada muscular um pouco mais desenvolvida que o infundíbulo posterior (Figuras 18A, B, C). Esta porção do oviduto é responsável pela gravidez (ovíparas) ou gestação (vivíparas) sendo constituído principalmente por glândulas tubulares simples ramificadas (uterinas) com núcleo basal e bastantes grânulos citoplasmáticos eosinofílicos (Figuras 18A). Nas espécies estudadas, o tamanho das glândulas uterinas apresenta mudanças de acordo com a fase do ciclo reprodutivo. Durante a vitelogênese secundária, as glândulas aumentam em tamanho e preenchem toda a lâmina própria da mucosa se comparadas às fêmeas em vitelogênese primária (Figura 18B). Na fase inativa folicular, as células das glândulas uterinas apresentam um núcleo basal com maior cromatina condensada e poucos vacúolos secretores eletrodensos no citoplasma (Figura 19A). Já durante a fase ativa dos folículos, essas células se caracterizam por um núcleo com maior cromatina descondensada e muitos vacúolos secretores eletrodensos (Figura 19B).

Na análise visual dos cortes histológicos do útero é possível observar que as serpentes ovíparas (*P. patagoniensis*, *L. miliaris* e *O. guibei*) apresentam um maior número de glândulas uterinas que a espécie vivípara deste estudo (*T. dorsatus*) (Figuras 18A, C). Nas quatro espécies estudadas, o epitélio luminal do útero é do tipo cubóide simples com células ciliadas e células secretoras (Figuras 19C, D). No epitélio do útero também é possível identificar ductos por onde é liberado o produto das glândulas uterinas (Figura 19E). Por meio da MET é possível observar que as células secretoras do útero apresentam um núcleo irregular, alongado com cromatina descondensada, e vacúolos eletrolucentes na porção apical da célula (Figura 19F). A análise histoquímica pelo Tricrômico de Mallory revelou fibras de colágeno distribuídas ao redor das glândulas tubulares uterinas no tecido conjuntivo (Figuras 20A, B). Quando coradas pelo Picrosirius essas fibras de colágeno não apresentaram variação em serpentes ovíparas e vivíparas, sendo constituídas principalmente por fibras de colágeno tipo I (laranja) (Figuras 20C, D, E, F).

Durante a gravidez (ovíparas) ou gestação (vivíparas) mudanças estruturais do oviduto são observadas. Em *T. dorsatus* (espécie vivípara) a fase inicial de gestação se caracteriza por bastante vitelo depositado nas câmaras incubatórias uterinas com posterior desenvolvimento de uma placenta corioalantóide (Figura 21A, B). Análises histoquímicas foram positivas para AB e PAS na porção apical das células do epitélio luminal em todas as espécies (Figuras 21C, D, E). Entretanto, se detectou um aumento na secreção de carboidratos neutros em sincronia com o

desenvolvimento folicular e a presença espermática (Figuras 21E). As glândulas tubulares uterinas reagiram de forma negativa para AB, PAS (Figuras 21C, D) e ABr.

Junção útero-vaginal (JUV): esta porção se caracteriza por apresentar pregas longas, sulcos profundos e camada muscular bem desenvolvida (Figuras 22A, B, C). Observam-se dois tipos de musculatura lisa, a camada mais interna circular e uma mais externa longitudinal (Figura 22B). A JUV é desprovida de glândulas na sua túnica mucosa, o que sugere uma função diferente do útero. Os sulcos podem abrigar grupos de espermatozóides agindo como refúgio físico, porém não é descartada a possibilidade de refúgio químico ou de nutrição (Figura 23A). O epitélio é do tipo pseudo-estratificado com células ciliadas em sua maioria de núcleo elíptico ou alongado e células caliciformes com secreção apócrina e merócrina (Figuras 23B, C, D, E, F).

O método histoquímico do Tricrômico de Mallory mostrou que o tecido conjuntivo é composto em parte por fibras de colágeno (ciano) e capilares (vermelho) (Figuras 24A, B). Na camada muscular se observaram numerosos mastócitos (vermelho)(Figuras 24A, B). A JUV apresentou fibras de colágeno do tipo I (laranja) entremeadas com fibras reticulares (verdes) ou tipo III quase na mesma proporção (Figuras 24C, D, E, F). Da mesma maneira que as porções ovidutais já descritas, o epitélio da JUV apresentou uma positividade para AB e PAS em diversas estações do ano em todas as espécies (Figura 25A, B). Em *T. dorsatus* foi observado uma positividade nas células caliciformes na presença de esperma (Figura 25B). Já em *P. patagoniensis* se detectou positividade na porção apical das células durante estocagem de esperma (Figura 25C).

Vagina: nas quatro espécies estudadas, esta região apresenta uma lâmina própria grossa, com pregas e uma camada muscular bem desenvolvida (Figura 26A, B, C). Uma das principais características na identificação microscópica da vagina é a presença de aglomerados de células mastócitos espalhadas na sua lâmina própria (Figura 26A, B). Análise histoquímica pelo Tricrômico de Mallory mostrou uma positividade para fibras de colágeno (azul celeste) entremeadas com células mastócitos (vermelho) na lâmina própria da vagina (Figura 27A, B). As fibras de colágeno da vagina são compostas por fibras reticulares (verdes) e fibras de colágeno tipo I (laranja), porém com menor birrefringência se comparadas a outras porções do oviduto (Figura 27C, D, E, F). A composição das fibras de colágeno do oviduto não apresentou diferenças entre as espécies, porém sim entre as diferentes porções nele contidas.

A vagina é constituída por um epitélio colunar pseudo-estratificado com células ciliadas esparsas e células secretoras (Figura 28A). Já o epitélio da cloaca é do tipo estratificado pavimentoso e é facilmente diferenciável do revestimento vaginal (Figura 28B). Pela MET é possível observar que a vagina apresenta um núcleo arredondado eucromático, com vacúolos secretores eletrolucentes e microvilosidades (Figura 28C). A vagina é a porção ovidutal que mostra maior densidade de desmossomos entre as células (Figura 28C). A produção de grânulos pelas células secretoras é elevada na maioria das estações do ano em todas as espécies (Figura 28A, C, D, E, F). A histoquímica da vagina mostrou reação positiva para carboidratos neutros e glicosaminoglicanos carboxilados em todas as espécies. Entretanto, foi observado que o corante AB (pH 2,5) reagiu de uma forma mais intensa que o PAS em fêmeas gestantes e grávidas (Figura 28E). Assim, naquelas espécies que apresentaram esperma na vagina a reação foi contrária, com o PAS corando de uma maneira mais intensa (Figura 28F).

Figura 10 - Secções transversais do infundíbulo de *Oxyrhopus guibei* e *Tomodon dorsatus*

(A) Fotomicrografia do infundíbulo anterior em *O. guibei* onde pode ser observado o óstio infundibular (10x)(H/E). (B) Infundíbulo posterior em *O. guibei* constituído pela mucosa, muscular e serosa, e também glândulas tubulares infundibulares ciliadas (10x)(F/T). (C) Infundíbulo posterior de *T. dorsatus* (10x)(F/T). GTI: glândulas tubulares infundibulares ciliadas; L: lúmen; Lp: lâmina própria; muc: mucosa; M: muscular; Oi: óstio infundibular; S: serosa; SG: sulcos glandulares; TC: tecido conjuntivo

Fonte: Rojas (2013)

Figura 11-Fotomicrografias do infundíbulo posterior de *Philodryas patagoniensis* e *Oxyrhopus guibei*

(A) Secção transversal de infundíbulo posterior de *P. patagoniensis* com glândulas tubulares infundibulares ciliadas na lâmina própria (10x-H/E). (B) Infundíbulo posterior de *L. miliaris* com glândulas tubulares ciliadas laterais (C) Fotomicrografia de corte longitudinal do infundíbulo posterior de *O. guibei* pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). GTI: glândulas tubulares infundibulares ciliadas; L: lúmen; M: muscular; Pr: pregas infundibulares; Sg: sulco glandular; TC: tecido conjuntivo

Fonte: Rojas, 2013

Figura 12 - Fotomicrografias do infundíbulo posterior das quatro espécies investigadas

(A) Ultraestrutura da glândula tubular infundibular em *L. miliaris* (B) MET dos cílios com corpúsculo basal associado a estereocílios (C) Corte transversal do epitélio infundibular de *T. dorsatus* observado pela ML (100x- T/F) (D) MEV do infundíbulo posterior de *O. guibei* com algumas células ciliadas e muitas células secretoras com microvilos. (E) MEV do epitélio infundibular de *O. guibei* com células secretoras liberando grânulos no lúmen. (F) MET do epitélio infundibular de *P. patagoniensis*. Cb: corpúsculo basal; Cc: células ciliadas; Ci: cílios; Cs: células secretoras; Cs(gr): células secretoras com grânulos; E: estereocílios; Ep: epitélio; fc: fibras de colágeno; L: lúmen; m: mitocôndrias; mv: microvilos; ms: matriz secretora; ne: núcleo elíptico; N: núcleo; Pr: prega infundibular; Tc: tecido conjuntivo; Vse: vacúolos secretores.

Fonte: Rojas, 2013

Figura 13 - Infundíbulo posterior com receptáculos de esperma em *Liophis miliaris*

(A) Fotomicrografia dos receptáculos de esperma em um animal eutanasiado no outono (10x-H/E). (B) Grupos de espermatozoides orientados paralelamente dentro de um receptáculo (40x-H/E). (C) MEV evidenciando aglomeração de espermatozoides nos receptáculos de esperma do infundíbulo. ca: cabeça dos espermatozoides; cd: cauda dos espermatozoides; L: lúmen; M: muscular; RE: receptáculos de esperma (*): espermatozoides

Fonte: Rojas (2013)

Figura 14 - Secções transversais do infundíbulo posterior de *Oxyrhopus guibei*

(A) Corte transversal mostrando o limite entre o infundíbulo e o útero (10x -H/E). (B) Receptáculo de esperma com epitélio cubóide e espermatozóides alinhados paralelamente (40x-H/E). (C) Receptáculo de esperma com epitélio pavimentoso (40x-H/E). Ec epitélio cubóide; Epa: epitélio pavimentoso; GTU: glândula tubular uterina; L: lúmen; RE: receptáculo de esperma; TC: tecido conjuntivo; (*): espermatozóides.

Fonte: Rojas (2013)

Figura 15 - Fotomicrografia do infundíbulo posterior em *Philodryas patagoniensis* e *Tomodon dorsatus*

(A) Receptáculos de esperma e glândulas uterinas em *P. patagoniensis* (10x-H/E). (B) Grupos de espermatozoides orientados paralelamente dentro de um receptáculo em *P. patagoniensis* (40x-H/E). (C) Receptáculo vazio em *T. dorsatus* (10x -T/F). Cm: células mióides; Ec: epitélio cubóide; GTU: glândula tubular uterina; L: lúmen; M: muscular; RE: receptáculos de esperma com material amorfo; Tci: tufo de cílios; (*): espermatozoides.

Fonte: Rojas (2013)

Figura 16 - Cortes transversais do infundíbulo posterior corados por diferentes métodos histoquímicos

(A) Receptáculos de esperma no infundíbulo de *L. miliaris* (20x). (B) Infundíbulo posterior de *L. miliaris* com esperma corado pelo método de Tricrômico de Mallory (20x). (C) Infundíbulo posterior de *T. dorsatus* (4x). (D) Corte histológico de infundíbulo de *T. dorsatus* corado pelo método de picrosirius (4x). (E) Glândulas tubulares ciliadas do infundíbulo posterior em *T. dorsatus* (40X). (F) Mesmo espécime da figura anterior corado pelo método histoquímico de picrosirius (20x). Ca: cabeça de espermatozóide; cd: cauda de espermatozóide; ci: cílios; Fc: fibras de colágeno; FiI: fibras de colágeno tipo I; FiIII: fibras de colágeno tipo III; GTI: glândula tubular infundibular; L: lúmen; RE: receptáculo de esperma; TC: tecido conjuntivo; (*): espermatozoides.

Fonte: Rojas (2013)

Figura 17 - Cortes transversais do infundíbulo posterior corados por diferentes métodos histoquímicos

(A) Epitélio luminal positivo para o Ácido Periódico Schiff (PAS) em *T. dorsatus* (20x). (B) Reação positiva para o método histoquímico de Alcian Blue (AB) no epitélio luminal de *T. dorsatus* (20x). (C) Receptáculo de esperma com positividade fraca para AB na porção apical da célula em *L. miliaris* (40x). (D) Positividade forte para PAS no citoplasma do receptáculo de esperma em *L. miliaris* (40x). (E) RE com reação positiva para PAS em *O. guibei* (40x). (F) Positividade forte para PAS em *P. patagoniensis* (40x) AB+: positividade para o Alcian Blue; GTU: glândula tubular uterina; L: lúmen; PAS+: positividade ao Ácido Periódico Schiff; RE: receptáculo de esperma; TC: tecido conjuntivo; (*): espermatozoides.

Fonte: Rojas (2013)

Figura 18 - Secções transversais de útero de *Philodryas patagoniensis* e *Liophis miliaris*

(A) Corte transversal do útero de *P. patagoniensis* em fase inativa (20x-H/E). Inseto: glândulas uterinas com núcleo basal e grânulos eosinofílicos (100X-H/E) (B) Glândulas tubulares na lâmina própria do útero de *L. miliaris* durante a vitelogênese secundária (4x-H/E). (C) Útero de *T. dorsatus* (20x-H/E). Gr: grânulos eosinofílicos; GTU: glândula tubular uterina; L: lúmen; lp: lâmina própria; M: muscular; N: núcleo

Fonte: Rojas (2013)

Figura 19 – Corte histológico e ultraestrutura do útero em *Oxyrhopus guibei*, *Philodryas patagoniensis* e *Liophis miliaris*

(A) Ultraestrutura de útero de *O. guibei* na fase inativa uterina (B) Glândulas uterinas durante a fase ativa em *P. patagoniensis*. (C) Corte transversal do útero de *L. miliaris*, onde se observa um epitélio com células ciliadas e secretoras. (D) MEV do epitélio uterino de *L. miliaris*. (E) Ducto uterino observado pela MEV em *P. patagoniensis*. (F) Epitélio uterino de *L. miliaris* com vacúolos secretores na porção apical da célula. Cc: células ciliadas; Ci: cílios; Cs: células secretoras; dm: desmossomo; Du: ducto uterino; fc: fibras de colágeno; GTU: glândula tubular uterina; JO: junção de oclusão; L: lúmen; m: mitocôndrias; mv: microvilos; N: núcleo; Vse: vacúolos secretores.

Fonte: Rojas (2013)

Figura 20 - Cortes transversais de útero corados por diferentes métodos histoquímicos

(A) Fotomicrografia de útero de *T. dorsatus* (40x). (B) Útero do mesmo espécime evidenciando fibras de colágeno no tecido conjuntivo (40x). (C) Útero de *L. miliaris* (4x) (D) Fotomicrografia do mesmo animal observado pela microscopia de polarização após coloração com picosírius (4x). (E e F) Cortes transversais de útero em *T. dorsatus* evidenciando poucas glândulas uterinas e fibras de colágeno do tipo I (20x). Ca: capilares uterinos; Ep: epitélio; Fc: fibras de colágeno; Fil: fibras de colágeno tipo I; GTU: glândula tubular uterina; L: lúmen; M: muscular; Pr: pregas uterinas; Sg: sulcos glandulares; TC: tecido conjuntivo.

Fonte: Rojas (2013)

Figura 21 - Cortes transversais do útero de diferentes espécies

(A) Epitélio uterino na fase inicial de gestação com bastante vitelo em *T. dorsatus* (40x-H/E). (B) Secção transversal de estrutura placentária em *T. dorsatus* (40x - T/F). (C) Epitélio uterino com reação positiva para PAS em *O. guibei* em vitelogênese secundária (10x). (D) Reação positiva pelo método histoquímico de AB no epitélio uterino e negativa para as glândulas uterinas em *L. miliaris* (40x). (E) Epitélio uterino com esperma no lúmen e reação positiva para PAS em *T. dorsatus* (40x). AB+: positividade para o Alcian Blue; ca (m): capilares maternos; ca (f): capilares fetais; Ec: epitélio coriônico escamoso; Eu: epitélio uterino; GTU: glândulas tubulares uterinas; L: lúmen; M: muscular; mec: membrana da casca; Oo: ooplasma; PAS+: positividade ao Ácido Periódico Schiff; cabeça seta branca (vacúolos); seta curta preta (vitelo) (*): espermatozóides.

Fonte: Rojas (2013)

Figura 22 - Secções transversais da junção útero-vaginal (JUV) em *Liophis miliaris* e *Philodryas patagoniensis*

(A) Fotomicrografia da junção útero-vaginal de *P. patagoniensis* com pregas e sulcos muito profundos (4x-H/E). (B) J.U.V. de *L. miliaris* apresentando o mesmo padrão estrutural com camada muscular circular e longitudinal (10x-H/E). (C) MEV da junção útero-vaginal de *L. miliaris*. L: lúmen; M: muscular; Mc: muscular circular; MI: muscular longitudinal; Pr: pregas; S: sulcos.

Fonte: Rojas (2013)

Figura 23 – Ultraestrutura e corte histológico da junção útero-vaginal em *Liophis miliaris*, *Tomodon dorsatus* e *Oxyrhopus guibei*

(A) MEV da junção útero-vaginal em *L. miliaris* mostrando sulcos profundos e presença de espermatozóides dentro destes. (B) Corte transversal da JUV de *T. dorsatus* apresentando epitélio pseudo-estratificado com células ciliadas e secretoras (100x -T/F). (C) MEV em *O. guibei* da mesma região descrita anteriormente com cílios muito altos. (D) Epitélio da JUV observado pela MET em *L. miliaris*. (E) Ultraestrutura da JUV com células caliciformes e secreção apócrina em *T. dorsatus* (F) Secreção merócrina das vesículas secretoras na JUV de *L. miliaris* Cc: células ciliadas; cin: canalículo intercelular; Cs: células secretoras; Ci: cílios; dm: desmossomo; JO: junção de oclusão; L: lúmen; Lb: lâmina basal; m: mitocôndrias; ne: núcleo elíptico; Pr: pregas; S: sulcos; Tc: tecido conjuntivo; Vse: vesículas secretoras; (*): espermatozóides.

Fonte: Rojas (2013)

Figura 24 – Secções transversais da junção útero-vaginal de *Tomodon dorsatus*, *Oxyrhopus guibei* e *Philodryas patagoniensis* corados pelo Tricrômico de Mallory e Picrosirius

(A) Corte transversal da JUV de *T. dorsatus* (20x). (B) JUV de *T. dorsatus* corado pelo Tricrômico de Mallory, com tecido conjuntivo (ciano), capilares e mastócitos (magenta) (20x). (C) Corte transversal de JUV de *O. guibei* (20x). (D) Fotomicrografia da JUV de *O. guibei* corada pelo picrosirius (20x). (E) Secção transversal da JUV de *P. patagoniensis* (20x). (F) Fibras do tipo I e III no tecido conjuntivo da JUV em *P. patagoniensis* (40x). ca: capilares sanguíneos; Ep: epitélio; Fc: fibras de colágeno; FiI: fibras de colágeno tipo I; FiIII: fibras de colágeno tipo III; L: lúmen; Ma: mastócitos; Pr: pregas; TC: tecido conjuntivo

Fonte: Rojas (2013)

Figura 25 - Cortes transversais da junção útero-vaginal de *Tomodon dorsatus* e *Philodryas patagoniensis* com reação positiva para Alcian Blue e Ácido Periódico Schiff

(A) Reação positiva dos grânulos produzidos pelas células secretoras caliciformes para o método histoquímico de AB em *T. dorsatus* (40x). (B) Epitélio uterino com reação positiva para PAS e presença de espermatozoides no lúmen em *T. dorsatus* (40x). (C) Reação positiva da porção apical das células secretoras para PAS em *P. patagoniensis* (40x). AB+: positividade para o Alcian Blue; Cc: células ciliadas; Cs: células secretoras; L: lúmen; lb: lâmina basal; PAS+: positividade ao Ácido Periódico Schiff; TC: tecido conjuntivo; (*): espermatozoides.

Fonte: Rojas (2013)

Figura 26 – Fotomicrografia de corte histológico e ultraestrutura da vagina de *Tomodon dorsatus*, *Oxyrhopus guibei* e *Liophis miliaris*

(A) Fotomicrografia da vagina de *T dorsatus* e sua relação com a JUV (4x-H/E). (B) Vagina de *O. guibei* apresentando camada muscular, mastócitos e epitélio bastante secretor (4x-H/E). (C) MEV da vagina de *L. miliaris* com espermatozoides em contato com epitélio. Ep(s): epitélio secretor; JUV: junção útero-vaginal; L: lúmen; M: muscular; Ma: mastócitos; Pr: pregas; S: sulcos; V: vagina; V-C: Vagina-Cloaca; (*): espermatozoides.

Fonte: Rojas (2013)

Figura 27 – Secções transversais da vagina de *Tomodon dorsatus* e *Philodryas patagoniensis* coradas pelo Tricrômico de Mallory e Picrosirius

(A) Corte transversal da vagina de *T dorsatus* com células mastócitos no tecido conjuntivo (10x). (B) Fibras de colágeno observadas na vagina quando corada pelo Tricrômico de Mallory (10x). (C) Fotomicrografia de vagina de *P. patagoniensis* (20x). (D) Microscopia de polarização evidenciando fibras de colágeno na vagina de *P. patagoniensis* (20x). Ep: epitélio; Fc: fibras de colágeno; FiI: fibras de colágeno tipo I; FiIII: fibras de colágeno tipo III; L: lúmen; M: muscular; Ma: mastócitos; TC: tecido conjuntivo.

Fonte: Rojas (2013)

Figura 28 – Cortes histológicos e ultraestrutura do epitélio vaginal e da cloaca, em *Tomodon dorsatus*, *Liophis miliaris* e *Oxyrhopus guibei*

A) Corte transversal da vagina de *T dorsatus* apresentando um epitélio colunar pseudo-estratificado com células ciliadas e secretoras (40x-T/F). (B) Secção transversal da cloaca caracterizada por um epitélio estratificado pavimentoso (40x-T/F). (C) MET da vagina de *L. miliaris* com vacúolos secretores no citoplasma. Inseto: desmossomos. (D) MEV do epitélio luminal de *O. guibei* onde se observa cílios, ductos e grânulos secretores. (E) Epitélio vaginal com reação positiva para o AB (pH 2,5) em *T dorsatus* durante a gestação (20x). (F) Corte transversal de vagina de *T. dorsatus* corado pelo PAS (40x). Cc: células ciliadas; Ci: cílios; Cs: células secretoras; dm: desmossomos; Du: ducto; Eep: epitélio estratificado pavimentoso; Gr: grânulos; L: lúmen; Lb: lâmina basal; mv: microvilos; N: núcleo; TC: tecido conjuntivo; Vse: vacúolos secretores

Fonte: Rojas, 2013

4.2 CICLO REPRODUTIVO DE *LIOPHIS MILIARIS*

4.2.1 Região Sul

O ciclo reprodutivo de *L. miliaris* na população da região Sul apresentou um padrão sazonal com folículos em vitelogênese secundária no outono e na primavera, porém ovos unicamente no final da primavera e início do verão (Figura 29). As análises histológicas mostraram que os espécimes estudados de *L. miliaris* dessa região acasalaram no final de outono e início de inverno (Figura 29). Contudo, a estocagem de gametas nos receptáculos seminais ocorreu durante todo ano, inclusive numa fêmea grávida durante o verão (Figura 29).

Figura 29 – Variação sazonal do diâmetro do maior folículo ovariano e ovos em fêmeas de *Liophis miliaris* da região Sul do Brasil

Triângulos: folículos em vitelogênese primária; Círculo preto: folículos em vitelogênese secundária; Círculo branco: ovos; Seta: época de acasalamento.

Fonte: Rojas (2013)

Além das variações macroscópicas foram observadas mudanças microscópicas estruturais no oviduto de *L. miliaris* de acordo com o diferente estágio reprodutivo (Quadro 1).

Quadro 1 – Variações microscópicas do oviduto em fêmeas de *Liophis miliaris* da região Sul do Brasil

Morfometria ovidutal	Pré-vitelogênicas (µm)	Vitelogênicas (µm)	Grávidas (µm)
Altura do epitélio ciliado infundíbulo ⁽²⁾	9,35 ± 3,58	11,37 ± 2,84	12,24 ± 5,34
Altura do epitélio secretor infundíbulo ⁽²⁾	9,36 ± 2,64	11,08 ± 2,68 (**)	9,57 ± 3,28
Diâmetro da glândula tubular do infundíbulo ⁽³⁾	34,48 ± 13,69	52,34 ± 16,40 (***)	36,73 ± 14,10
Altura epitelial da glândula tubular do infundíbulo ⁽²⁾	10,82 ± 3,94 (**)	15,67 ± 4,68	15,70 ± 9,04
Altura do epitélio ciliado uterino ⁽²⁾	7,35 ± 2,67	14,97 ± 7,42 (***)	4,10 ± 1,83
Altura do epitélio secretor uterino ⁽²⁾	7,85 ± 3,20	14,64 ± 6,42 (***)	3,29 ± 1,57
Diâmetro dos capilares uterinos ⁽³⁾	7,54 ± 3,91	8,01 ± 3,33	14,67 ± 2,16 (**)
Diâmetro das glândulas uterinas ⁽³⁾	22,79 ± 15,20	38,98 ± 17,76 (***)	17,90 ± 3,20
Altura do epitélio ciliado da JUV ⁽²⁾	17,83 ± 9,73	24,17 ± 9,95 (*)	20,50 ± 2,94
Altura do epitélio secretor da JUV ⁽²⁾	14,75 ± 6,40	22,12 ± 8,87 (**)	16,46 ± 1,96
Altura do epitélio ciliado da vagina ⁽¹⁾	32,12 ± 17,05 (***)	44,48 ± 16,83	45,02 ± 6,34
Altura do epitélio secretor da vagina ⁽²⁾	30,24 ± 17,47	50,53 ± 32,16 (***)	36,83 ± 3,98

Valores expressos como média e desvio padrão (n = 19)

Diferenças significativas como (*) P < 0,05, (**) P < 0,01, (***) P < 0,001 – ANOVA ⁽¹⁾, Kruskal Wallis ⁽²⁾ e ANCOVA ⁽³⁾

Análises histoquímicas pelo PAS e AB revelaram padrões distintos de secreção entre as diferentes porções do oviduto e também entre as estações do ano. O epitélio infundibular não mostrou notáveis diferenças na positividade durante o ano todo, no entanto, os receptáculos seminais apresentaram uma reação forte para PAS na presença de gametas masculinos (Tabela 3). A reação para AB nos receptáculos seminais foi fraca independentemente do esperma estocado, porém, foi forte no epitélio luminal em animal grávidico durante o verão (Tabela 3). O útero e a JUV mostraram uma reação moderada para PAS na porção apical do epitélio luminal, durante outono-primavera (Tabela 3). O epitélio luminal da vagina mostrou uma reação de forte a moderada durante o ano todo (Tabela 3).

Tabela 3 – Variação sazonal da secreção ovidutal de *Liophis miliaris* da região Sul do Brasil

	Outono		Inverno		Primavera		Verão	
	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB
Infundíbulo	III***	I	III***	I	III*	I	II*	III*
Útero	II*	I*	I*	I*	II*	I*	I*	I*
JUV	II*	I*	I*	I*	II*	II*	I*	I*
Vagina	III*	II*	II*	II*	III*	II*	II*	II*

Positividade: I = fraco, II = moderado, III = forte. Local de reação: (*) epitélio luminal, (**) receptáculos de esperma, (***) epitélio luminal e receptáculos de esperma

4.2.2 Região Sudeste

Na região Sudeste a distribuição de folículos e ovos ocorre de forma similar à apresentada pela população do Sul, entretanto, podemos observar ovos em duas estações diferentes (outono e primavera) no mesmo ano (Figura 30). A estação de acasalamento em *L. miliaris* do Sudeste ocorre no outono e foi corroborada pela presença de esperma na vagina, tanto

em espécimes do Estado de São Paulo como de Minas Gerais (Figura 30). Mudanças microscópicas estruturais do oviduto mostram um padrão semelhante ao da população do Sul do Brasil (Quadro 2). O epitélio secretor (todo o oviduto) se caracterizou por uma maior atividade em fêmeas vitelogênicas (Quadro 2). Foi observada estocagem de esperma nos receptáculos seminais durante todo o ano (Figura 30).

Figura 30 – Variação sazonal do diâmetro do maior folículo ovariano e ovos em fêmeas de *Liophis miliaris* da região Sudeste do Brasil

Triângulos: folículos em vitelogênese primária; Círculo preto: folículos em vitelogênese secundária; Círculo branco: ovos; Seta: época de acasalamento

Fonte: Rojas (2013)

Variações na atividade secretora do oviduto se caracterizaram por uma positividade forte para PAS no citoplasma dos receptáculos seminais durante a estocagem, independente da época do ano. O Alcian Blue (AB) teve uma reação fraca na porção apical dos receptáculos (Tabela 4). O epitélio luminal do infundíbulo mostrou uma positividade forte para PAS durante o outono, inverno e primavera, e para AB unicamente durante primavera (Tabela 4). Positividade forte para PAS foi observada no epitélio luminal do útero durante outono e primavera (Tabela 4). A JUV mostrou reação moderada para PAS e AB no inverno e forte no outono-primavera (Tabela 4). Já a vagina se caracterizou por uma atividade secretora forte para PAS e AB na maioria das estações do ano (Tabela 4).

Quadro 2 – Variações microscópicas estruturais do oviduto em fêmeas de *Liophis miliaris* da região Sudeste do Brasil

Morfometria ovidutal	Pré-vitelogênicas (µm)	Vitelogênicas (µm)	Grávidas (µm)
Altura do epitélio ciliado infundíbulo ⁽¹⁾	10,01 ± 3,05	14,83 ± 5,75 (***)	10,93 ± 3,23
Altura do epitélio secretor infundíbulo ⁽¹⁾	8,71 ± 2,19	16,04 ± 7,32 (***)	11,06 ± 2,38
Diâmetro da glândula tubular do infundíbulo ⁽²⁾	32,17 ± 7,62	42,61 ± 16,57 (***)	27,72 ± 11,68
Altura epitelial da glândula tubular do infundíbulo ⁽¹⁾	11,13 ± 2,60	15,95 ± 5,65 (**)	9,22 ± 3,89
Altura do epitélio ciliado uterino ⁽¹⁾	6,66 ± 2,99	11,32 ± 2,98 (**)	10,02 ± 1,77
Altura do epitélio secretor uterino ⁽¹⁾	6,66 ± 3,74	12,21 ± 3,15 (***)	8,26 ± 1,79
Diâmetro dos capilares uterinos ⁽²⁾	8,27 ± 2,90	8,26 ± 3,05	7,55 ± 1,87
Diâmetro das glândulas uterinas ⁽²⁾	19,42 ± 8,81	36,62 ± 15,62 (***)	15,47 ± 7,03
Altura do epitélio ciliado da JUV ⁽¹⁾	17,87 ± 4,39	29,48 ± 11,62 (***)	20,58 ± 4,57
Altura do epitélio secretor da JUV ⁽¹⁾	16,20 ± 4,34	26,72 ± 12,14 (***)	19,32 ± 4,37
Altura do epitélio ciliado da vagina ⁽¹⁾	32,82 ± 13,41	23,70 ± 9,03 (**)	36,15 ± 5,31
Altura do epitélio secretor da vagina ⁽¹⁾	32,68 ± 13,92	25,58 ± 9,24 (*)	30,45 ± 4,14

Valores expressos como média e desvio padrão (n = 22).

Diferenças significativas como (*) P < 0,05, (**) P < 0,01, (***) P < 0,001 – Kruskal Wallis ⁽¹⁾ e ANCOVA ⁽²⁾

Tabela 4 – Mudanças na secreção ovidutal de *Liophis miliaris* do Sudeste do Brasil

	Outono		Inverno		Primavera		Verão	
	PAS	AB	PAS	AB	PA	AB	PAS	AB
Infundíbulo	III***	II*	III**	I	III***	III*	II**	I*
Útero	III*	I*	I*	II*	III*	II*	I*	I*
JUV	III*	I*	II*	II*	III*	III*	I*	I*
Vagina	III*	II*	III*	III*	III*	III*	II*	II*

Positividade: I = fraco, II = moderado, III = forte. Local de reação: (*) epitélio luminal, (**) receptáculos de esperma, (***) epitélio luminal e receptáculos de esperma

4.2.2.1 Ultraestrutura do Ciclo Ovidutal

Infundíbulo posterior: o epitélio desta porção ovidutal é constituído por células ciliadas e secretoras. As células ciliadas possuem núcleo heterocromático alongado, com aglomerados de mitocôndrias e corpúsculos basais na região apical da célula (Figura 31A). Já as células secretoras possuem núcleo eucromático ou heterocromático (dependente da estação) de formato arredondado ou alongado e vacúolos secretores no citoplasma (Figura 31A). Nos animais vitelogênicos de outono-inverno foram observados bastantes vacúolos secretores eletrodensos ocupando aproximadamente toda a célula secretora (Figura 31A). Em serpentes grávidas e após a ovipostura essas células apresentam poucos vacúolos secretores no citoplasma (Figura 31B). Durante outono-inverno as células secretoras apresentam uma maior atividade do retículo endoplasmático rugoso (RER) e liso (REL) e algumas mitocôndrias (Figura 31C). Os vacúolos secretores observados no infundíbulo posterior são liberados por meio de um processo apócrino (Figura 31D).

Dentro do infundíbulo também são encontradas glândulas tubulares constituídas principalmente por células ciliadas e escassas células secretoras (Figura 31E). As células do epitélio dessas glândulas apresentam núcleo heterocromático com mitocôndrias na região apical e

cílios mais longos se comparados ao epitélio luminal indundibular (Figura 31E). No outono foi possível observar espermatozóides dentro das glândulas tubulares do infundíbulo (Figura 31F).

Útero: o epitélio possui basicamente células secretoras e poucas células ciliadas em toda sua extensão. As células secretoras apresentam núcleo heterocromático com muitas mitocôndrias ao redor do núcleo (Figura 32A). Na porção apical da célula secretora podem ser observados microvilos e vacúolos secretores eletrolucentes (brancos) a levemente eletrodensos (cinzas), os quais não mudam desse padrão durante o ciclo reprodutivo (Figura 32A). Nesta porção do oviduto também são encontradas as glândulas tubulares uterinas (desprovidas de cílios) (Figura 32B). Essas glândulas são separadas umas das outras dentro do útero, por tecido conjuntivo constituído por fibras de colágeno (Figura 32B). A produção de vacúolos citoplasmáticos eletrodensos aumenta em fêmeas em vitelogênese secundária e diminui em fêmeas grávidas e em vitelogênese primária (Figura 32B). Os vacúolos citoplasmáticos do epitélio luminal e das glândulas uterinas são liberados por secreção merócrina (Figura 32A, B).

Junção útero-vaginal (JUV): É o local do oviduto que apresenta a maior concentração de células ciliadas com bastantes mitocôndrias e canalículos intercelulares na porção lateral da célula (Figura 32C). No entanto, durante outono e primavera são observadas células secretoras que se caracterizam por um núcleo eucromático, citoplasma com vacúolos de material floculento e bastantes mitocôndrias na região apical (Figura 32C). No verão foram observados macro vacúolos eletrodensos produzidos pelas células secretoras e distribuídos no epitélio da junção útero-vaginal (animal em vitelogênese primária) (Figura 32D). A liberação para o lúmen dos macro vacúolos eletrodensos ocorre por secreção apócrina (Figura 32D).

Vagina: constituída principalmente por células colunares secretoras, com núcleo basal e vacúolos secretores que ocupam o citoplasma quase que em sua totalidade (Figura 32E). A densidade de células ciliadas varia dependendo da estação do ano (Figura 32E). Os vacúolos secretores são eletrolucentes (brancos) durante outono-inverno e levemente eletrodensos (cinza) na primavera-verão (Figura 32E). O material secretor é liberado por secreção merócrina e a borda luminal é constituída por microvilos (Figura 32E). O epitélio vaginal exibe um padrão secretor constante e se caracteriza por células cheias de vacúolos, RER e Aparelho de Golgi (AG) durante o ano todo (Figura 32F). Durante o outono foi observado liberação de material secretor e esperma no epitélio vaginal e no lúmen (Figura 33A, B, C).

Figura 31 – Ultraestrutura do epitélio infundibular e das glândulas tubulares infundibulares ciliadas de *Liophis miliaris*

(A) Ultraestrutura do epitélio infundibular durante outono-inverno (B) Células secretoras do infundíbulo em fêmea gravídica na primavera (C). Célula secretora do infundíbulo com retículo endoplasmático desenvolvido e mitocôndrias. (D) Liberação dos vacúolos secretores por secreção apócrina. (E) Glândulas tubulares infundibulares com cílios compridos e abundantes. (F) Esperma dentro de glândulas tubulares do infundíbulo durante o outono Cb: corpúsculo basal; Cc: células ciliadas; Ci: cílios; Cs: células secretoras; en: envoltório nuclear; fc: fibras de colágeno; L: lúmen; lb: lâmina basal; m: mitocôndrias; mv: microvilos; N: núcleo; ne: núcleo espermatozóide; pi: peça intermediária espermatozóide; rb: ribossomos; REL: retículo endoplasmático liso; RER: retículo endoplasmático rugoso; sa: secreção apócrina; Vse: vacúolos secretores

Fonte: Rojas (2013)

Figura 32 – Microscopia eletrônica de transmissão da junção útero-vaginal de *Liophis miliaris*

(A) Fotomicrografia do útero, JUV e vagina de *L. miliaris*. (A) Ultraestrutura de epitélio luminal do útero (B) Glândula uterina em fêmea em vitelogênese primária. (C) Epitélio luminal da JUV de fêmea no outono. (D) Macro vacúolos eletrodensos na JUV de serpente durante o verão. Inseto: secreção apócrina de macro vacúolos. (E) Epitélio vaginal de fêmea na primavera. Inseto: secreção merócrina de vacúolos. (F) Aparelho de Golgi e vacúolos na célula vaginal. Inseto: numerosos RER. AG: Aparelho de Golgi; Cc: células ciliadas; Ci: cílios; cin: canalículos intercelulares; fc: fibras de colágeno; L: lúmen; lb: lâmina basal; m: mitocôndrias; mv: microvilos; MVse: macro vacúolos secretores; N: núcleo; RER: Retículo endoplasmático rugoso; sh: secreção holócrina; sm: secreção merócrina; Vse: vacúolos secretores.

Fonte: Rojas (2013)

Figura 33 – Microscopia eletrônica de varredura da vagina de *Liophis miliaris*

(A) Ultraestrutura de epitélio luminal da vagina com ducto e material secretor (B) Epitélio luminal da vagina de fêmea no outono com presença de espermatozoides. (C) Aglomerado de espermatozoides no lúmen vaginal durante a época de acasalamento no outono. Cc: células ciliadas; Cs: células secretoras; Du: ducto secretor; Ev: epitélio vaginal; se: secreção; Sz: espermatozoides

Fonte: Rojas (2013)

4.2.3 Região Nordeste

Na região Nordeste, o ciclo de *L. miliaris* mostrou vitelogênese secundária no outono, inverno e primavera, e presença de ovos unicamente na primavera (Figura 34). Na primavera, análises histológicas pela ML demonstraram a presença de abundante esperma no lúmen da vagina em duas fêmeas, indicando a época de acasalamento (Figura 34).

Figura 34 – Ciclo folicular, presença de ovos e estocagem de esperma em *Liophis miliaris* no Nordeste do Brasil

Triângulos: folículos em vitelogênese primária; Círculo preto: folículos em vitelogênese secundária; Círculo branco: ovos, Seta: época de acasalamento

Fonte: Rojas (2013)

O ciclo reprodutivo de *L. miliaris* do Nordeste é diferente do descrito para a população do Sul e Sudeste. Entretanto, variações nos estágios reprodutivos são semelhantes para algumas porções ovidutais (Quadro 3). As análises histoquímicas caracterizam um padrão secretor sazonal para algumas porções ovidutais (Tabela 5).

Quadro 3 – Padrão de variações microscópicas ovidutais em fêmeas de *Liophis miliaris* da região Nordeste do Brasil

Morfometria ovidutal	Pré-vitelogênicas (µm)	Vitelogênicas (µm)	Grávidas (µm)
Altura do epitélio ciliado infundíbulo ⁽¹⁾	8,62 ± 3,73	8,86 ± 2,40	6,14 ± 0,88
Altura do epitélio secretor infundíbulo ⁽¹⁾	8,45 ± 2,86	10,12 ± 3,49 (*)	5,06 ± 1,07
Diâmetro da glândula tubular do infundíbulo ⁽²⁾	47,72 ± 27,08 (**)	39,67 ± 13,13	26,26 ± 3,09
Altura epitelial da glândula tubular do infundíbulo ⁽¹⁾	19,30 ± 13,15 (**)	14,46 ± 4,89	7,54 ± 1,19
Altura do epitélio ciliado uterino ⁽¹⁾	8,04 ± 2,67	9,78 ± 1,90 (*)	7,84 ± 1,18
Altura do epitélio secretor uterino ⁽¹⁾	9,01 ± 2,76	9,54 ± 2,62 (*)	7,32 ± 1,29
Diâmetro dos capilares uterinos ⁽²⁾	7,53 ± 2,23	8,69 ± 3,81 (*)	7,00 ± 1,64
Diâmetro das glândulas uterinas ⁽²⁾	26,27 ± 7,11	35,86 ± 9,16 (***)	15,29 ± 2,79
Altura do epitélio ciliado da JUV ⁽¹⁾	15,00 ± 6,73 (**)	12,76 ± 2,84	9,24 ± 1,24
Altura do epitélio secretor da JUV ⁽¹⁾	12,63 ± 4,26 (**)	11,76 ± 2,12	8,51 ± 0,73
Altura do epitélio ciliado da vagina ⁽¹⁾	26,25 ± 7,37	32,51 ± 10,24 (***)	20,86 ± 1,87
Altura do epitélio secretor da vagina ⁽¹⁾	29,10 ± 7,31	33,18 ± 14,17 (*)	23,00 ± 1,58

Valores expressos como média e desvio padrão (n = 17).

Diferenças significativas como (*) P < 0,05, (**) P < 0,01, (***) P < 0,001 – Kruskal Wallis ⁽¹⁾ e ANCOVA ⁽²⁾

Tabela 5 – Mudanças na secreção ovidutal de *Liophis miliaris* do Nordeste do Brasil

	Outono		Inverno		Primavera		Verão	
	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB
Infundíbulo	III**	I*	III**	II*	III***	II*	III***	II*
Útero	III*	I*	II*	II*	III*	III*	II*	II*
JUV	II*	I*	II*	II*	III*	III*	I*	II*
Vagina	II*	I*	III*	III*	III*	III*	II*	II*

Positividade: I = fraco, II = moderado, III = forte. Localização anatômica da reação histoquímica: (*) epitélio luminal, (**) receptáculos de esperma, (***) epitélio luminal e receptáculos de esperma

4.3 CICLO REPRODUTIVO DE *OXYRHOPUS GUIBEI*

4.3.1 Região Sul

O ciclo reprodutivo de *O. guibei* proveniente das cidades estudadas apresentou um desenvolvimento folicular (vitelogênese secundária) e presença de ovos na primavera-verão (Figura 35). Estocagem de esperma foi observada durante as estações de outono, verão e inverno (Figura 35). A época de acasalamento não foi caracterizada devido à ausência de esperma na vagina das amostras histológicas realizadas. Estocagem de esperma também foi observada em fêmeas grávidas o que indica a capacidade de múltiplas ninhadas a partir de uma única cópula. Análises histoquímicas mostraram que o epitélio infundibular se caracterizou por uma maior atividade para carboidratos neutros (PAS) durante o inverno, primavera e verão, já o AB teve uma maior positividade na primavera (Tabela 6). Os receptáculos de esperma apresentaram uma reação forte na presença de gametas masculinos (Tabela 6). O útero se caracterizou por uma positividade fraca para PAS e AB no outono, inverno e primavera, e moderada no verão (Tabela 6). Já a JUV mostrou uma positividade forte no inverno-verão para PAS e AB, e forte durante todo o ano no epitélio vaginal (Tabela 6). As análises morfométricas no oviduto de *O. guibei* indicaram uma maior atividade do infundíbulo em fêmeas pré vitelogênicas e grávidas, se

comparadas as vitelogênicas (Quadro 4). No entanto, a glândula tubular infundibular se mostrou mais ativa durante a vitelogênese secundária (Quadro 4). No útero, tanto o epitélio como a vascularização aumentaram durante a gravidez, diferentemente das glândulas uterinas (Quadro 4). O epitélio vaginal se mostrou constante durante todo o ciclo reprodutivo (Quadro 4).

Figura 35 – Ciclo folicular e estocagem de esperma de *Oxyrhopus guibei* do Sul do Brasil

Triângulos: folículos em vitelogênese primária; Círculo preto: folículos em vitelogênese secundária; Círculo branco: ovos

Fonte: Rojas (2013)

Tabela 6 – Padrão da secreção ovidutal em *Oxyrhopus guibei* do Sul do Brasil

	Outono		Inverno		Primavera		Verão	
	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB
Infundíbulo	I* II**	I***	III***	II*	III*	III*	III***	II*
Útero	I*	I*	I*	I*	I*	I*	II*	II*
JUV	I*	I*	III*	III*	I*	I*	III*	III*
Vagina	III*	III*	III*	III*	III*	III*	III*	III*

Positividade: I = fraco, II = moderado, III = forte. Localização anatômica da reação histoquímica: (*) epitélio luminal, (**) receptáculos de esperma, (***) epitélio luminal e receptáculos de esperma

Quadro 4 – Variações microscópicas estruturais do oviduto em fêmeas de *Oxyrhopus guibei* da região Sul do Brasil

Morfometria ovidutal	Pré-vitelogênicas (µm)	Vitelogênicas (µm)	Grávidas (µm)
Altura do epitélio ciliado infundíbulo ⁽¹⁾	13,82 ± 3,87 (***)	7,86 ± 2,13	6,91 ± 1,46
Altura do epitélio secretor infundíbulo ⁽¹⁾	15,01 ± 2,47 (***)	9,47 ± 2,87	10,04 ± 2,78
Diâmetro da glândula tubular do infundíbulo ⁽²⁾	35,65 ± 9,18	33,23 ± 6,62	35,86 ± 4,21
Altura epitelial da glândula tubular do infundíbulo ⁽¹⁾	9,64 ± 2,16	13,50 ± 4,66 (***)	9,75 ± 1,17
Altura do epitélio ciliado uterino ⁽¹⁾	7,32 ± 1,09	9,19 ± 1,42	11,79 ± 2,66 (**)
Altura do epitélio secretor uterino ⁽¹⁾	8,23 ± 1,72	8,45 ± 1,64	10,45 ± 1,04 (**)
Diâmetro dos capilares uterinos ⁽²⁾	7,05 ± 2,66	7,03 ± 1,98	9,28 ± 1,19 (**)
Diâmetro das glândulas uterinas ⁽²⁾	22,58 ± 7,64	50,32 ± 18,77(***)	28,85 ± 2,13
Altura do epitélio ciliado da JUV ⁽¹⁾	41,42 ± 21,30	23,22 ± 9,08	45,44 ± 3,94 (**)
Altura do epitélio secretor da JUV ⁽¹⁾	43,33 ± 23,34 (**)	25,43 ± 11,17	37,29 ± 1,91
Altura do epitélio ciliado da vagina ⁽¹⁾	61,24 ± 28,86 (*)	43,77 ± 13,62	60,02 ± 7,39
Altura do epitélio secretor da vagina ⁽¹⁾	64,95 ± 26,45	64,91 ± 10,99	61,91 ± 6,19

Valores expressos como média e desvio padrão (n = 14).

Diferenças significativas como (*) P < 0,05, (**) P < 0,01, (***) P < 0,001 – Kruskal Wallis ⁽¹⁾ e ANCOVA ⁽²⁾

4.3.2 Região Sudeste

O. guibei do Sudeste do Brasil apresentou um ciclo folicular distinto da população do Sul caracterizado por um desenvolvimento folicular durante o ano todo e duas fêmeas grávidas durante a primavera (Figura 36). Armazenamento de gametas masculinos no infundíbulo ocorreu durante outono, inverno e verão (Figura 36). Análises histológicas da vagina detectaram esperma no lúmen durante o verão e inverno indicando acasalamento recente (Figura 36). A morfometria ovidutal se caracterizou por diminuição do epitélio infundibular e aumento das glândulas tubulares do infundíbulo em fêmeas grávidas (Quadro 5). O útero foi mais ativo em fêmeas vitelogênicas e grávidas, porém, uma maior vascularização se observou durante a gravidez (Quadro 5). O epitélio da JUV e vagina teve menor atividade em fêmeas grávidas (Quadro 5). O infundíbulo se caracterizou por uma positividade de moderada a forte (PAS) em todas as estações investigadas (Tabela 7). Já útero mostrou uma positividade fraca para PAS e AB em serpentes grávidas na primavera. A JUV reagiu fortemente durante primavera para PAS e AB, e moderada no inverno-verão (Tabela 7). O epitélio vaginal apresentou positividade forte para PAS durante o ano todo (Tabela 7).

Figura 36 – Ciclo folicular e estocagem de esperma de *Oxyrhopus guibei* do Sudeste do Brasil

Triângulos: folículos em vitelogênese primária; Círculo preto: folículos em vitelogênese secundária; Círculo branco: ovos, Seta: época de acasalamento

Quadro 5 – Variações microscópicas estruturais do oviduto em fêmeas de *Oxyrhopus guibei* da região Sudeste do Brasil

Morfometria ovidutal	Pré-vitelogênicas (µm)	Vitelogênicas (µm)	Grávidas (µm)
Altura do epitélio ciliado infundíbulo ⁽¹⁾	11,65 ± 4,00	13,19 ± 4,11 (**)	7,71 ± 1,83
Altura do epitélio secretor infundíbulo ⁽¹⁾	12,88 ± 4,17	12,91 ± 4,61 (*)	7,56 ± 2,02
Diâmetro da glândula tubular do infundíbulo ⁽²⁾	37,99 ± 17,10	35,85 ± 10,61	43,93 ± 56,00 (**)
Altura epitelial da glândula tubular do infundíbulo ⁽¹⁾	15,08 ± 10,80 (**)	11,90 ± 4,05	10,47 ± 1,87
Altura do epitélio ciliado uterino ⁽¹⁾	7,12 ± 1,71	11,96 ± 3,45 (***)	10,76 ± 2,08
Altura do epitélio secretor uterino ⁽¹⁾	7,13 ± 1,35	11,72 ± 3,42	12,66 ± 2,64 (**)
Diâmetro dos capilares uterinos ⁽²⁾	7,58 ± 2,40	7,16 ± 2,34	9,81 ± 3,37 (*)
Diâmetro das glândulas uterinas ⁽²⁾	19,14 ± 5,59	47,39 ± 23,10 (***)	35,95 ± 3,07
Altura do epitélio ciliado da JUV ⁽¹⁾	27,90 ± 17,45 (*)	26,65 ± 16,35	19,18 ± 3,16
Altura do epitélio secretor da JUV ⁽¹⁾	27,02 ± 16,75 (*)	24,84 ± 17,52	19,51 ± 3,74
Altura do epitélio ciliado da vagina ⁽¹⁾	54,43 ± 18,32	83,69 ± 25,39 (***)	55,50 ± 6,29
Altura do epitélio secretor da vagina ⁽¹⁾	59,89 ± 14,26	93,76 ± 46,38 (***)	59,09 ± 4,91

Valores expressos como média e desvio padrão (n = 24).

Diferenças significativas como (*) P < 0,05, (**) P < 0,01, (***) P < 0,001 – Kruskal Wallis ⁽¹⁾ e ANCOVA ⁽²⁾

Tabela 7 – Análises histoquímicas do oviduto de *Oxyrhopus guibei* do Sudeste do Brasil

	Outono		Inverno		Primavera		Verão	
	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB
Infundíbulo	III***	II* I**	III***	II*	III*	II*	III***	II*
Útero	II*	II*	III*	I*	I*	I*	II*	II*
JUV	I*	II*	II*	I*	III*	III*	II*	II*
Vagina	III*	III*	III*	I*	III*	III*	III*	III*

Positividade: I = fraco, II = moderado, III = forte. Localização anatômica da reação histoquímica: (*) epitélio luminal, (**) receptáculos de esperma, (***) epitélio luminal e receptáculos de esperma

4.3.2.1 Ultraestrutura do Ciclo Ovidutal

Infundíbulo posterior: apresenta a mesma estrutura tecidual e celular que a observada em *L. miliaris* sendo o epitélio luminal infundibular constituído por células ciliadas e secretoras. Durante outono, inverno e verão podem ser observados um aumento da produção de vacúolos levemente eletrodensos e alguns eletrolucentes (material floculento) pelas células secretoras (Figura 37A). O núcleo das células secretoras está localizado na região basal da célula e apresenta formato alongado com cromatina descondensada e nucléolo proeminente (Figura 37B). Os vacúolos secretores observados no infundíbulo posterior são liberados por meio de secreção merócrina (Figura 37C, D). Entre as células secretoras e ciliadas são observados complexos unitivos (Figura 37C). Na primavera, as células secretoras do infundíbulo se caracterizam por uma diminuição na sua atividade e se observam poucos vacúolos secretores no citoplasma (Figura 37E). As glândulas tubulares ciliadas do infundíbulo de *O. guibei* apresentam a mesma conformação estrutural que em *L. miliaris* (Figura 37F). As células apresentam núcleo heterocromático com mitocôndrias na região apical e cílios longos (Figura 37F). A presença de vacúolos endocíticos (fagossomos) com espermatozóides no seu interior em associação com lisossomos no citoplasma da célula, sugere uma função de espermiofagia (Figura 38A, B). Os espermatozóides não estocados nos receptáculos seminais sofrem endocitose quando entram em contato com o epitélio das glândulas tubulares infundibulares (Figura 38A).

Útero: *O. guibei* possui epitélio uterino constituído por células secretoras e ciliadas, das quais as primeiras são observadas em maior número se comparadas às segundas. As células secretoras do epitélio uterino se caracterizam pelo núcleo irregular, microvilos, número elevado de mitocôndrias e produção de vacúolos secretores (Figura 38C). Em *O. guibei* a maior aglomeração de mitocôndrias dentro do oviduto ocorre nas células secretoras do epitélio uterino (Figura 38C). Durante a vitelogênese secundária em *O. guibei* pode ser observada uma maior atividade do epitélio uterino e das glândulas uterinas, se comparadas às fêmeas em vitelogênese primária e as grávidas (Figura 38D, E). As células das glândulas uterinas apresentam núcleo basal, vacúolos secretores e retículo endoplasmático rugoso desenvolvido o que sugere produção de proteínas (Figura 38E, F). Os vacúolos citoplasmáticos do epitélio luminal e das glândulas uterinas são liberados por secreção merócrina.

Junção útero-vaginal (JUV): Esta porção do oviduto é desprovida de glândulas e possui um epitélio altamente ciliado associado a células secretoras (Figura 39A). As células secretoras apresentam diminuição de secreção na porção apical da célula em fêmeas pré-vitelogênicas. No entanto, o material eletrolucente armazenado lembra o formato de célula caliciforme observada no intestino delgado de várias espécies de vertebrados (Figura 39A). Essas células mostraram uma menor densidade de vacúolos eletrolucentes durante outono (Figura 39A). Uma característica peculiar da JUV em *O. guibei* é a presença de canálculos intercelulares bem desenvolvidos (Figura 39B). No inverno foi possível detectar esperma no lúmen da JUV em uma fêmea em vitelogênese primária (Figura 39C).

Vagina: Em *O. guibei* o epitélio da vagina é constituído por células colunares globosas altamente secretoras, com núcleo basal e vacúolos que ocupam a maior parte do citoplasma (Figura 39D). A secreção de material (vacúolos) não apresenta variação durante as estações do ano e se caracteriza principalmente por vacúolos eletrolucentes a levemente eletrodensos (Figura 39D). As células ciliadas também são observadas, porém em menor número e comprimidas pelas células secretoras (Figura 39E). A secreção na vagina de *O. guibei* ocorre por meio dos processos merócrino e holócrino (Figura 39E). A vagina se distingue das demais porções ovidutais, por apresentar aglomerados de mastócitos no tecido conjuntivo e um epitélio com número alto de desmossomos (junções intercelulares) (Figura 39F).

Figura 37 – Ultraestrutura do epitélio infundibular de *Oxyrhopus guibei* com células secretoras e ciliadas

(A) Epitélio infundibular em atividade secretora durante outono, inverno e verão (B) Células secretoras com núcleo basal e vacúolos secretores (C) Complexo unitivo e secreção merócrina no epitélio infundibular (D) MEV da secreção merócrina de vacúolos em *O. guibei*. (E) Epitélio infundibular com diminuição da atividade secretora durante a primavera (F) Glândulas tubulares infundibulares com cílios compridos e abundantes. ca: capilar sanguíneo; Cc: células ciliadas; Ci: cílios; cin: canaliculo intercelular; Cs: células secretoras; dm: desmossomo; ec: euromatina; Fb: fibroblastos; fc: fibras de colágeno; hc: heterocromatina; hemidesmossomo: L: lúmen; lb: lâmina basal; m: mitocôndrias; mv: micróvilos; N: núcleo; nu: nucléolo; sm: secreção merócrina; Vse: vacúolos secretores; Vse (d): vacúolos secretores eletrodensos; Vse(l): vacúolos secretores eletrolucentes; ZA: zônula de adesão; Zo: zônula de oclusão

Fonte: Rojas (2013)

Figura 38 -Ultraestrutura das glândulas tubulares infundibulares e do útero em *Oxyrhopus guibei*

(A e B) Fagossomo com espermatozóide no epitélio da glândula tubular do infundíbulo. Inseto: endocitose de espermatozóide (cabeça de seta branca). (C) MET de epitélio luminal do útero (D) Glândula uterina em fêmea grávida. (E) Células da glândula uterina de fêmea em vitelogênese secundária no inverno. (F) Célula da glândula uterina com retículo endoplasmático e vacúolos eletrodensos AG: Aparelho de Golgi; ax: axonema; bf: bainha fibrosa; Ci: cílios; dm: desmossomo; Epl: epitélio luminal; eu: eucromatina; fa: fagossomo; fc: fibras de colágeno; hc: heterocromatina; L: lúmen; lb: lâmina basal; lso: lisossomo; m: mitocôndrias; mv: microvilos; N: núcleo; nu: nucléolo; pi: peça intermediária espermatozóide; RER: Retículo endoplasmático rugoso; Vse: vacúolos secretores; Vse(d): vacúolos secretores eletrodensos; Vse(l): vacúolos secretores eletrolucentes; ZO: zônula de oclusão

Fonte: Rojas (2013)

Figura 39 – Microscopia eletrônica de transmissão da junção útero-vaginal e vagina em *Oxyrhopus guibei*

(A) MET da JUV com material eletrolucente armazenado na porção apical da célula secretora. (B) Células da JUV com canálculos intercelulares. (C) Esperma no lúmen da JUV em fêmea no inverno. (D) Vagina de *O. guibei* com vacúolos secretores no citoplasma. (E) MET do epitélio vaginal com liberação de material por secreção holócrina. (F) Junção intercelular do epitélio vaginal de *O. guibei*. Inseto: mastócito com grânulos de estrutura irregular. Ax: axonema; bf: bainha fibrosa; Cc: células ciliadas; Ci: cílios; cin: canálculos intercelulares; Cs: célula secretora; dm: desmossomo; eu: eucromatina; fc: fibras de colágeno; Gr: grânulos; hc: heterocromatina; L: lúmen; lb: lâmina basal; m: mitocôndrias; N: núcleo; nu: nucléolo; sh: secreção holócrina; Vse: vacúolos secretores; Vse (l): vacúolos secretores eletrolucentes; Sz: espermatozóide

Fonte: Rojas (2013)

4.3.3 Região Nordeste

Os espécimes das cidades provenientes da região Nordeste mostraram um ciclo folicular com atividade gonadal assazonal durante as estações do ano, e ovos no inverno (Figura 40). Nesses espécimes investigados não foi possível detectar receptáculos preenchidos de esperma, entretanto, a estocagem não pode ser descartada, pois foram observados receptáculos vazios durante o ano todo (Figura 40). De acordo com os cortes histológicos da vagina foi possível observar esperma no verão e inverno o qual indicou duas estações de cópula para a espécie investigada (Figura 40). As variações na morfometria microscópica do oviduto durante o ciclo reprodutivo mostraram variações inter e intrarregionais ovidutais (Quadro 6). O estudo histoquímico do epitélio secretor infundibular apresentou positividade moderada a forte durante o ano todo (Tabela 8). O útero se caracterizou por uma atividade secretora fraca para PAS e AB no inverno, já a JUV apresentou positividade fraca para AB em todas as estações (Tabela 8). A vagina evidenciou um padrão de secreção constante durante o ciclo reprodutivo (Tabela 8).

Figura 40– Ciclo folicular de *Oxyrhopus guibei* do Nordeste do Brasil

Triângulos: folículos em vitelogênese primária; Círculo preto: folículos em vitelogênese secundária; Círculo branco: ovos, Seta: época de acasalamento

Fonte: Rojas (2013)

Quadro 6 – Variações microscópicas estruturais do oviduto em fêmeas de *Oxyrhopus guibei* da região Nordeste do Brasil

Morfometria ovidutal	Pré-vitelogênicas (µm)	Vitelogênicas (µm)	Grávidas (µm)
Altura do epitélio ciliado infundíbulo ⁽¹⁾	7,99 ± 1,69	9,89 ± 4,22 (*)	7,54 ± 1,59
Altura do epitélio secretor infundíbulo ⁽¹⁾	9,34 ± 2,08	11,55 ± 3,19 (**)	8,87 ± 0,74
Diâmetro da glândula tubular do infundíbulo ⁽²⁾	28,75 ± 11,28	38,70 ± 12,27 (***)	32,82 ± 10,58
Altura epitelial da glândula tubular do infundíbulo ⁽¹⁾	9,83 ± 3,15	16,12 ± 7,75 (***)	10,18 ± 2,15
Altura do epitélio ciliado uterino ⁽¹⁾	8,09 ± 1,65	10,71 ± 2,94 (**)	7,56 ± 0,78
Altura do epitélio secretor uterino ⁽¹⁾	8,19 ± 1,58	11,16 ± 2,98 (**)	9,72 ± 1,44
Diâmetro dos capilares uterinos ⁽²⁾	6,46 ± 1,62	6,22 ± 1,58	7,89 ± 1,85 (*)
Diâmetro das glândulas uterinas ⁽²⁾	32,48 ± 10,20	53,39 ± 16,09 (***)	19,40 ± 2,06
Altura do epitélio ciliado da JUV ⁽¹⁾	10,78 ± 5,33	20,48 ± 9,42 (***)	9,11 ± 1,69
Altura do epitélio secretor da JUV ⁽¹⁾	10,33 ± 4,21	17,27 ± 8,24 (***)	11,01 ± 3,17
Altura do epitélio ciliado da vagina ⁽¹⁾	32,70 ± 20,42	53,55 ± 15,21 (***)	30,42 ± 2,38
Altura do epitélio secretor da vagina ⁽¹⁾	34,04 ± 20,70	53,05 ± 13,95 (***)	37,48 ± 2,89

Valores expressos como média e desvio padrão (n = 16)

Diferenças significativas como (*) P < 0,05, (**) P < 0,01, (***) P < 0,001 – Kruskal Wallis ⁽¹⁾ e ANCOVA ⁽²⁾

Tabela 8 – Análises histoquímicas do oviduto de *Oxyrhopus guibei* do Nordeste do Brasil

	Outono		Inverno		Primavera		Verão	
	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB
Infundíbulo	II*	III*	III*	III*	II*	III*	II*	II*
Útero	II*	III*	I*	I*	II*	I*	II*	III*
JUV	II*	I*	II*	I*	II*	I*	II*	I*
Vagina	III*	III*	III*	I*	III*	III*	III*	I*

Positividade: I = fraco, II = moderado, III = forte. Localização anatômica da reação histoquímica: (*) epitélio luminal, (**) receptáculos de esperma, (***) epitélio luminal e receptáculos de esperma

4.4 CICLO REPRODUTIVO DE *PHILODRYAS PATAGONIENSIS*

4.4.1 Região Sul

Os espécimes de *P. patagoniensis* da população do Sul do Brasil apresentaram folículos em vitelogênese secundária durante as quatro estações do ano, contudo, ovos foram encontrados unicamente nas estações do inverno e primavera (Figura 41). Esperma no lúmen da vagina foi observado em duas fêmeas durante outono o que caracteriza o acasalamento nessa estação (Figura 41). As fêmeas que apresentaram esperma na vagina evidenciaram folículos em vitelogênese secundária. Receptáculos de esperma foram notados no infundíbulo, entretanto, estes se apresentaram vazios nos espécimes estudados (Figura 41). Análises histoquímicas (PAS e AB) no oviduto de *P. patagoniensis* revelaram um aumento da atividade secretora no inverno e primavera (Tabela 9). O epitélio secretor do infundíbulo e do útero apresentou uma positividade forte para PAS no inverno-primavera, a JUV de forte a moderada no inverno-primavera, e a vagina forte no inverno-verão (Tabela 9). As medidas morfométricas indicaram um incremento

da atividade secretora em fêmeas grávidas (Quadro 7). A atividade glandular do útero aumentou em fêmeas vitelogênicas e o epitélio (secretor e ciliado) da JUV foi mais ativo nas grávidas. A vagina apresentou menor atividade em fêmeas pré-vitelogênicas e grávidas (Quadro 7).

Figura 41– Ciclo folicular de *Philodryas patagoniensis* do Sul do Brasil

Triângulos: folículos em vitelogênese primária; Círculo preto: folículos em vitelogênese secundária; Círculo branco: ovos, Seta: época de acasalamento

Fonte: Rojas (2013)

Tabela 9 – Padrão de secreção do oviduto de *Philodryas patagoniensis* do Sul do Brasil

	Outono		Inverno		Primavera		Verão	
	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB
Infundíbulo	III*	III*	III*	III*	III*	III*	II*	III*
Útero	I*	I*	III*	II*	III*	II*	I*	I*
JUV	II*	I*	III*	II*	III*	II*	I*	I*
Vagina	II*	II*	III*	III*	II*	II*	III*	III*

Positividade: I = fraco, II = moderado, III = forte. Localização anatômica da reação histoquímica: (*) epitélio luminal, (**) receptáculos de esperma, (***) epitélio luminal e receptáculos de esperma

Quadro 7 – Morfometria microscópica do oviduto em fêmeas de *Philodryas patagoniensis* da região Sul do Brasil

Morfometria ovidutal	Pré-vitelogênicas (µm)	Vitelogênicas (µm)	Grávidas (µm)
Altura do epitélio ciliado infundíbulo ⁽¹⁾	9,64 ± 3,35	13,36 ± 4,03 (***)	11,84 ± 2,87
Altura do epitélio secretor infundíbulo ⁽¹⁾	10,13 ± 2,66	11,87 ± 2,92	14,98 ± 1,02 (***)
Diâmetro da glândula tubular do infundíbulo ⁽²⁾	37,84 ± 22,37	108,73 ± 22,82 (***)	30,67 ± 7,78
Altura epitelial da glândula tubular do infundíbulo ⁽¹⁾	11,76 ± 5,84	14,65 ± 3,81 (**)	11,18 ± 2,17
Altura do epitélio ciliado uterino ⁽¹⁾	10,28 ± 3,78	10,59 ± 2,28	14,29 ± 3,00 (***)
Altura do epitélio secretor uterino ⁽¹⁾	10,34 ± 4,33	11,61 ± 2,94	15,25 ± 2,30 (***)
Diâmetro dos capilares uterinos ⁽²⁾	12,41 ± 9,10	10,69 ± 6,72	8,04 ± 1,74
Diâmetro das glândulas uterinas ⁽²⁾	22,51 ± 10,33	57,39 ± 18,18 (***)	18,40 ± 3,82
Altura do epitélio ciliado da JUV ⁽¹⁾	19,84 ± 11,45	20,70 ± 8,02	26,74 ± 8,71 (**)
Altura do epitélio secretor da JUV ⁽¹⁾	18,97 ± 1,68	19,32 ± 7,83	24,73 ± 6,14
Altura do epitélio ciliado da vagina ⁽¹⁾	44,73 ± 17,03	47,28 ± 25,09	41,86 ± 12,46
Altura do epitélio secretor da vagina ⁽¹⁾	44,44 ± 14,71	57,34 ± 27,30 (*)	56,33 ± 24,76

Valores expressos como média e desvio padrão (n = 21)

Diferenças significativas como (*) P < 0,05, (**) P < 0,01, (***) P < 0,001 – Kruskal Wallis ⁽¹⁾ e ANCOVA ⁽²⁾

4.4.2 Região Sudeste

A população de *P. patagoniensis* dos locais coletados apresentou um ciclo reprodutivo sazonal, com folículos em vitelogênese secundária a partir de inverno e durante a primavera (Figura 42). Nas fêmeas estudadas foi possível identificar ovos no inverno, primavera e verão, contudo, os cortes histológicos não identificaram esperma na vagina o qual caracteriza acasalamento recente (Figura 42). Em *P. patagoniensis* foram observados dois locais de estocagem de gametas, o primeiro dentro de receptáculos de esperma no infundíbulo posterior e o segundo nos sulcos da JUV (Figura 42). A estocagem observada tanto nos receptáculos de esperma como na JUV ocorreram durante primavera-verão (Figura 42). O achado mais importante desse tipo de estratégia reprodutiva foi presença de esperma estocado na JUV em fêmeas grávidas (verão) e que acabaram de realizar ovipostura (primavera-verão).

Os estudos histoquímicos pelo PAS revelaram que os receptáculos de esperma e as células secretoras da JUV aumentam a produção de grânulos ricos em carboidratos neutros na presença de esperma (Tabela 10). A resposta para AB foi fraca em ambos locais de estocagem e indicou pouca atividade para glicosaminoglicanos carboxilados (ácidos). A positividade para PAS e AB nas diferentes porções ovidutais apresentou uma maior positividade no inverno, primavera e verão (Tabela 10). Variações microscópicas estruturais mostraram um aumento da atividade infundibular e uterina em fêmeas vitelogênicas. O epitélio ciliado da JUV se manteve sem variação nos diferentes estágios reprodutivos, já o epitélio secretor foi mais ativo nas fêmeas vitelogênicas (Quadro 8). A vagina mostrou maior atividade epitelial em fêmeas pré-vitelogênicas (Quadro 8).

Figura 42 – Ciclo folicular e estocagem de esperma em *Philodryas patagoniensis* do Sudeste do Brasil

Triângulos: folículos em vitelogênese primária; Círculo preto: folículos em vitelogênese secundária; Círculo branco: ovos

Fonte: Rojas (2013)

Tabela 10 – Padrão de secreção do oviduto de *Philodryas patagoniensis* do Sudeste do Brasil

	Outono		Inverno		Primavera		Verão	
	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB
Infundíbulo	I*	I*	III*	III*	III***	III*	III***	III*
Útero	I*	I*	II*	II*	III*	II*	I*	I*
JUV	I*	I*	II*	III*	III ^{SZ}	I*	III ^{SZ}	II*
Vagina	III*	III*	III*	III*	III*	III*	II*	II*

Positividade: I = fraco, II = moderado, III = forte. Localização anatômica da reação histoquímica: (*) epitélio luminal, (**) receptáculos de esperma, (***) epitélio luminal e receptáculos de esperma, (SZ) esperma JUV

Quadro 8 – Morfometria microscópica do oviduto em fêmeas de *Philodryas patagoniensis* da região Sudeste do Brasil

Morfometria ovidutal	Pré-vitelogênicas (µm)	Vitelogênicas (µm)	Grávidas (µm)
Altura do epitélio ciliado infundíbulo ⁽¹⁾	7,44 ± 1,64	13,44 ± 6,02 (**)	9,87 ± 4,39
Altura do epitélio secretor infundíbulo ⁽¹⁾	8,86 ± 1,87	12,98 ± 4,19 (***)	9,55 ± 5,32
Diâmetro da glândula tubular do infundíbulo ⁽²⁾	30,61 ± 9,69	29,63 ± 9,61	25,36 ± 5,80
Altura epitelial da glândula tubular do infundíbulo ⁽¹⁾	9,50 ± 2,92	10,50 ± 2,71	8,46 ± 2,09
Altura do epitélio ciliado uterino ⁽¹⁾	9,28 ± 3,64	11,58 ± 6,76 (*)	6,62 ± 0,94
Altura do epitélio secretor uterino ⁽¹⁾	7,78 ± 2,86	11,91 ± 5,90 (***)	7,07 ± 1,08
Diâmetro dos capilares uterinos ⁽²⁾	6,35 ± 1,48	5,95 ± 1,48	5,36 ± 1,00
Diâmetro das glândulas uterinas ⁽²⁾	16,34 ± 4,29	35,01 ± 12,68 (***)	17,31 ± 4,91
Altura do epitélio ciliado da JUV ⁽¹⁾	21,06 ± 10,12	20,46 ± 10,39	22,15 ± 6,63
Altura do epitélio secretor da JUV ⁽¹⁾	18,17 ± 8,87	21,42 ± 12,03	20,71 ± 7,14
Altura do epitélio ciliado da vagina ⁽¹⁾	68,32 ± 29,15 (***)	51,78 ± 21,30	43,63 ± 14,57
Altura do epitélio secretor da vagina ⁽¹⁾	65,12 ± 28,66 (***)	54,74 ± 21,78	35,33 ± 10,71

Valores expressos como média e desvio padrão (n = 20)

Diferenças significativas como (*) P < 0,05, (**) P < 0,01, (***) P < 0,001 – Kruskal Wallis ⁽¹⁾ e ANCOVA ⁽²⁾

4.4.2.1 Ultraestrutura do Ciclo Ovidutal

Infundíbulo posterior: constituído por um epitélio de células ciliadas e secretoras, as quais apresentam variações na produção de material secretor durante o ciclo reprodutivo. Durante outono, o epitélio secretor do infundíbulo apresenta número reduzido de vacúolos secretores eletrolucentes, já no inverno-primavera a produção aumenta e os vacúolos se tornam eletrodensos (Figura 43A). Na fase ativa (inverno-primavera) o núcleo eucromático das células secretoras é arredondado e pode ser observado na porção apical da célula (Figura 43A). Durante o pico de produção, os vacúolos eletrodensos ocupam quase que na totalidade o citoplasma da unidade funcional (Figura 43A). Em toda a célula podem ser observadas mitocôndrias, AG e abundante RER, o qual sugere a produção de glicoproteínas (Figuras 43B, C). Na fase inativa (outono) o núcleo da célula é mais alongado, heterocromático com abundante mitocôndria e pequenos vacúolos eletrolucentes no citoplasma (Figura 43D). As células secretoras também são responsáveis pela pinocitose de fase fluida de material luminal amorfo observado no lúmen do infundíbulo (Figura 43E). O material citoplasmático produzido pela célula é liberado por secreção apócrina no lúmen do infundíbulo (Figura 43F). *P. patagoniensis* também apresenta glândulas tubulares no infundíbulo posterior com a mesma constituição morfológica que a descrita para *L. miliaris* e *O. guibei*.

Útero: Em *P. patagoniensis* o epitélio uterino é constituído por células secretoras e células ciliadas, as quais apresentam núcleo oval ou arredondado irregular (Figura 44A). As células secretoras possuem microvilos na porção apical da célula que aumentam a área de absorção pelo epitélio uterino (Figura 44A). Durante o inverno-primavera, fêmeas vitelogênicas mostraram um incremento da secreção de vacúolos eletrolucentes na porção apical das células secretoras (Figura 44A). As glândulas uterinas de fêmeas no mesmo estágio reprodutivo (vitelogênicas) aumentaram a produção de vacúolos eletrodensos também durante inverno-primavera (Figura 44B). Os vacúolos são produzidos por células com núcleo basal, de formato arredondado, e liberados por secreção merócrina para o lúmen da glândula (Figura 44B). Na região apical de cada célula da glândula uterina é possível observar a zona de oclusão entre as células (Figura 44B). Em fêmeas em vitelogênese primária e grávidas o citoplasma da célula apresenta poucos vacúolos e é constituído principalmente de RER (Figura 44C).

Junção útero-vaginal (JUV): porção ovidutal com função diferente ao útero já que não possui glândulas tubulares distribuídas na lâmina própria que sintetizem material protéico. O epitélio da JUV de *P. patagoniensis* é formado por células ciliadas (maior número) e células secretoras (menor número) (Figura 44D). Os cílios presentes nas células ciliadas são constituídos por um micro-túbulo central e um periférico, ambos envolvidos por uma membrana plasmática (Figura 44E). Entre os cílios distribuídos na porção apical (célula ciliada) podem ser observados prolongamentos longos e imóveis identificados como estereocílios (Figura 44E, F). *P. patagoniensis* foi a única espécie que mostrou invaginações do epitélio luminal formando túbulos ciliados no tecido conjuntivo (Figura 44F). Em fêmeas vitelogênicas, as células secretoras epiteliais aumentam a produção de vacúolos eletrolucos os quais são liberados no lúmen por secreção apócrina (Figura 45A). As células ciliadas mostram aglomerados de mitocôndrias na porção apical da célula, já as células secretoras AG e mitocôndrias na porção central (Figura 45A,B). A estocagem de esperma nessa porção ovidutal foi confirmada pela ML, no entanto, não foi possível observá-la pela MET.

Vagina: *P. patagoniensis* apresenta um epitélio vaginal composto por células secretoras colunares de núcleo basal com cromatina descondensada e vacúolos citoplasmáticos (Figura 45C). As células ciliadas também são observadas entre as células secretoras, contudo, as primeiras são comprimidas pelas segundas e apresentam formato triangular (Figura 45D). Durante verão, as células secretoras produzem vacúolos levemente eletrodensos se comparadas ao outono-inverno (Figura 45E). O tecido conjuntivo da vagina de *P. patagoniensis* se caracteriza por acúmulo de mastócitos de núcleo periférico eucromático e grânulos eletrodensos no citoplasma (Figura 45E). A secreção do material no lúmen da vagina ocorre por meio dos processos merócrino e holócrino como descrito para *O. guibei* (Figura 45F). No verão foi observado liberação de material floculento por secreção holócrina nas células secretoras da vagina (Figura 45F).

Figura 43 – Ultraestrutura do epitélio infundibular de *Philodryas patagoniensis* durante o ciclo reprodutivo

(A) Epitélio infundibular em atividade secretora durante inverno-primavera. (B e C) Organelas observadas nas células secretoras durante a fase ativa. (D) Fase inativa do epitélio infundibular durante outono (E) Pinocitose de fase fluida no epitélio infundibular durante o verão. (F) Liberação de material citoplasmático por secreção apócrina na célula secretora. AG: Aparelho de Golgi; Cc: células ciliadas; Ci: cílios; cin: canalículo intercelular; Cs: células secretoras; fc: fibras de colágeno; fci: Face cis do Aparelho de Golgi; ftr: Face trans do Aparelho de Golgi; L: lúmen; lb: lâmina basal; m: mitocôndrias; ma: material amorfo; mv: microvilos; N: núcleo; RER: Retículo endoplasmático rugoso; sa: secreção apócrina; Vse: vacúolos secretores; Vse (d): vacúolos secretores eletrodensos; cabeça de seta branca (invaginações da membrana)

Fonte: Rojas (2013)

Figura 44 - Microscopia eletrônica de transmissão do útero e junção útero-vaginal de *Philodryas patagoniensis*

(A) Epitélio uterino de fêmea em vitelogênese secundária com vacúolos eletrolucos (B) Glândula tubular uterina com produção de vacúolos eletrodensos no inverno-primavera. Inseto: secreção merócrina de vacúolos. (C) Células da glândula uterina com abundante RER em fêmea grávida. (D) MEV do epitélio luminal da JUV com abundantes células ciliadas (E) Porção apical de uma célula epitelial ciliada da JUV (F) Invaginação do epitélio luminal da JUV. Cb: corpúsculo basal; Cc: células ciliadas; Ci: cílios; Cs: células secretoras; E: estereocílios; eu: eucromatina; fc: fibras de colágeno; hc: heterocromatina; Ie: invaginação epitelial; L: lúmen; lb: lâmina basal; LO: lúmen ovidutal; m: mitocôndrias; mi (c): microtúbulo central; mi (p): microtúbulo periférico; mp: membrana plasmática microtúbulo; mv: microvilos; N: núcleo; RER: Retículo endoplasmático rugoso; sm: secreção merócrina; Vse: vacúolos secretores; Vse(d): vacúolos secretores eletrodensos; Vse(l): vacúolos secretores eletrolucos; ZO: zônula de oclusão

Fonte: Rojas (2013)

Figura 45 – Ultraestrutura do epitélio da junção útero-vaginal e vagina em *Philodryas patagoniensis*

(A) Epitélio luminal da JUV com secreção apócrina. (B) Região central da célula secretora do epitélio da JUV com abundante mitocôndrias e Aparelho de Golgi desenvolvido. (C) Epitélio vaginal com células secretoras colunares. (D) Célula ciliada comprimida por células secretoras no epitélio vaginal. (E) Células secretoras com vacúolos eletrodensos no outono-inverno. Inseto: mastócito vaginal (F) Liberação de vacúolos citoplasmáticos por secreção holócrina vaginal. AG: Aparelho de Golgi; Cc: células ciliadas; Ci: cílios; cin: canalículos intercelulares; Cs: célula secretora; fc: fibras de colágeno; Gr: grânulos; L: lúmen; m: mitocôndrias; mv: microvilos; N: núcleo; nu: nucléolo; RER: Retículo endoplasmático rugoso; sa: secreção apócrina; sh: secreção holócrina; Vse: vacúolos secretores; Vse (d): vacúolos secretores eletrodensos; Vse (f): vacúolos secretores com material floculento

Fonte: Rojas (2013)

4.5 CICLO REPRODUTIVO DE *TOMODON DORSATUS*

4.5.1 Região Sul

O presente estudo apesar de ter trabalhado com um número pequeno de amostras ou medidas macroscópicas observou que a vitelogênese secundária acontece a partir de outono e se estende até a primavera (Figura 46). Embriões foram observados no verão, outono e inverno o que caracteriza uma gestação extensa (Figura 46). Abundante esperma na vagina foi detectado em três fêmeas durante a primavera, o qual confirma a cópula durante essa estação (Figura 46). Receptáculos de esperma vazios foram observados no infundíbulo, no entanto, grupos de espermatozóides foram notados alinhados paralelamente na JUV durante o outono-inverno, o qual sugere provável local de estocagem (Figura 46). Análises histoquímicas revelaram uma positividade forte para PAS no epitélio infundibular durante a primavera (Tabela 11). O útero apresentou uma positividade moderada entre as estações do ano para PAS e AB (Tabela 11). A JUV teve uma positividade forte para PAS no outono-inverno e forte a moderada durante todo o ano para AB (Tabela 11). Já a vagina apresentou uma reação forte para AB no outono-inverno (Tabela 11). Em *T. dorsatus*, o epitélio e as glândulas do infundíbulo e do útero foram mais ativos em fêmeas vitelogênicas durante a primavera (Quadro 9). No entanto, o epitélio da JUV e vagina, assim como os capilares sanguíneos aumentaram em fêmeas gestantes (Quadro 9).

Figura 46 - Variação sazonal do diâmetro do maior folículo ovariano, embriões e estocagem de esperma em *Tomodon dorsatus* da região Sul do Brasil

Triângulos: folículos em vitelogênese primária; Círculo preto: folículos em vitelogênese secundária; Círculo branco: embriões; seta: cópula

Fonte: Rojas (2013)

Tabela 11 – Padrão de secreção do oviduto de *Tomodon dorsatus* do Sul do Brasil

	Outono		Inverno		Primavera		Verão	
	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB
Infundíbulo	II*	III*	I*	II*	III*	II*	II*	II*
Útero	II*	II*	I*	II*	II*	II*	II*	II*
JUV	III*	III*	III*	III*	II*	III*	I*	II*
Vagina	I*	III*	II*	III*	II*	II*	II*	III*

Positividade: I = fraco, II = moderado, III = forte. Localização anatômica da reação histoquímica: (*) epitélio luminal, (**) receptáculos de esperma, (***) epitélio luminal e receptáculos de esperma

Quadro 9 – Morfometria microscópica do oviduto de *Tomodon dorsatus* da região Sul do Brasil

Morfometria ovidutal	Pré-vitelogênicas (µm)	Vitelogênicas (µm)	Gestantes (µm)
Altura do epitélio ciliado infundíbulo ⁽¹⁾	11,74 ± 4,04	16,21 ± 4,80 (***)	6,04 ± 1,30
Altura do epitélio secretor infundíbulo ⁽¹⁾	12,10 ± 4,33	16,80 ± 4,76 (***)	2,23 ± 1,40
Diâmetro da glândula tubular do infundíbulo ⁽²⁾	32,39 ± 10,42	36,63 ± 9,11 (***)	26,36 ± 4,58
Altura epitelial da glândula tubular do infundíbulo ⁽¹⁾	10,43 ± 3,53	15,10 ± 4,28 (***)	6,97 ± 0,83
Altura do epitélio ciliado uterino ⁽¹⁾	11,20 ± 4,48	13,28 ± 7,30 (**)	4,59 ± 1,04
Altura do epitélio secretor uterino ⁽¹⁾	10,21 ± 3,53	10,45 ± 6,05 (**)	6,62 ± 2,05
Diâmetro dos capilares uterinos ⁽²⁾	14,69 ± 6,13	15,12 ± 6,59	39,07 ± 2,81 (***)
Diâmetro das glândulas uterinas ⁽²⁾	29,01 ± 7,47	41,12 ± 7,84 (***)	9,25 ± 1,88
Altura do epitélio ciliado da JUV ⁽¹⁾	15,24 ± 9,19	16,97 ± 5,42	21,06 ± 2,75
Altura do epitélio secretor da JUV ⁽¹⁾	12,43 ± 5,40	18,97 ± 6,34	19,80 ± 1,98 (*)
Altura do epitélio ciliado da vagina ⁽¹⁾	26,86 ± 18,13	22,43 ± 4,26	73,12 ± 1,90 (***)
Altura do epitélio secretor da vagina ⁽¹⁾	30,57 ± 21,44	23,36 ± 5,22	73,12 ± 1,90 (***)

Valores expressos como média e desvio padrão (n = 21)

Diferenças significativas como (*) P < 0,05, (**) P < 0,01, (***) P < 0,001 – Kruskal Wallis ⁽¹⁾ e ANCOVA ⁽²⁾

4.5.2 Região Sudeste

O ciclo reprodutivo de *T. dorsatus* do Sudeste do Brasil é semelhante ao observado para a população do Sul (Figura 47). Folículos em vitelogênese secundária foram observados a partir de inverno e durante a primavera (Figura 47). Esperma na vagina foi detectado na primavera numa fêmea em vitelogênese secundária indicando acasalamento recente, no entanto, não foi detectada estocagem na porção infundibular (Figuras 47). O infundíbulo apresentou um aumento da atividade secretora para PAS e AB durante inverno-primavera (Tabela 12). Já o epitélio uterino se mostrou mais ativo na produção de carboidratos neutros durante a primavera e a JUV no outono-inverno (Tabela 12). A vagina se caracterizou por uma diminuição da atividade secretora durante outono (Tabela 12). Na presença de esperma, o epitélio vaginal apresentou uma maior atividade secretora durante a primavera.

Variações estruturais do oviduto mostraram o mesmo padrão descrito para *T. dorsatus* do Sul do Brasil (Quadro 10). O epitélio infundibular e uterino se apresentou mais ativo em fêmeas vitelogênicas, assim como as glândulas tubulares (Quadro 10). Já os capilares sanguíneos aumentaram bastante nas gestantes (Quadro 10). A JUV e vagina se mostraram mais ativas em fêmeas em gestação (Quadro 10).

Figura 47 - Variação sazonal do diâmetro do maior folículo ovariano, embriões e época de cópula em *Tomodon dorsatus* da região Sudeste do Brasil.

Triângulos: folículos em vitelogênese primária; Círculo preto: folículos em vitelogênese secundária; Círculo branco: embriões; seta: cópula

Fonte: Rojas (2013)

Tabela 12 – Atividade secretora do oviduto de *Tomodon dorsatus* do Sudeste do Brasil.

	Outono		Inverno		Primavera		Verão	
	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB	PAS	AB
Infundíbulo	I*	I*	III*	II*	III*	II*	I*	I*
Útero	II*	II*	I*	I*	III*	II*	II*	II*
JUV	III*	II*	III*	II*	II*	II*	I*	I*
Vagina	I*	II*	III*	III*	III*	III*	II*	II*

Positividade: I = fraco, II = moderado, III = forte. Localização anatômica da reação histoquímica: (*) epitélio luminal, (**) receptáculos de esperma, (***) epitélio luminal e receptáculos de esperma

Quadro 10 – Morfometria microscópica do oviduto de *Tomodon dorsatus* do Sudeste do Brasil

Morfometria ovidutal	Pré-vitelogênicas (µm)	Vitelogênicas (µm)	Gestantes (µm)
Altura do epitélio ciliado infundíbulo ⁽¹⁾	6,45 ± 1,65	13,27 ± 6,42 (***)	8,99 ± 2,89
Altura do epitélio secretor infundíbulo ⁽¹⁾	5,54 ± 1,42	14,60 ± 7,68 (**)	10,90 ± 3,36
Diâmetro da glândula tubular do infundíbulo ⁽²⁾	32,20 ± 7,86	32,96 ± 13,01	35,13 ± 7,71
Altura epitelial da glândula tubular do infundíbulo ⁽¹⁾	9,04 ± 3,09	12,65 ± 4,93 (*)	10,84 ± 3,05
Altura do epitélio ciliado uterino ⁽¹⁾	8,21 ± 4,46	12,08 ± 5,98 (***)	2,84 ± 0,47
Altura do epitélio secretor uterino ⁽¹⁾	9,40 ± 6,70	11,12 ± 7,00	8,56 ± 2,37
Diâmetro dos capilares uterinos ⁽²⁾	11,79 ± 2,35	12,84 ± 3,71	22,58 ± 5,91 (***)
Diâmetro das glândulas uterinas ⁽²⁾	13,59 ± 4,17	18,25 ± 6,94 (***)	10,83 ± 1,63
Altura do epitélio ciliado da JUV ⁽¹⁾	11,08 ± 5,42	18,38 ± 12,61 (***)	16,20 ± 4,49
Altura do epitélio secretor da JUV ⁽¹⁾	12,25 ± 7,07	9,49 ± 2,58	17,26 ± 4,87 (***)
Altura do epitélio ciliado da vagina ⁽¹⁾	20,14 ± 13,78	20,66 ± 5,43	34,07 ± 9,89 (***)
Altura do epitélio secretor da vagina ⁽¹⁾	29,48 ± 21,38	34,60 ± 19,96	42,20 ± 13,59 (*)

Valores expressos como média e desvio padrão (n =22)

Diferenças significativas como (*) P < 0,05, (**) P < 0,01, (***) P < 0,001 – Kruskal Wallis ⁽¹⁾ e ANCOVA ⁽²⁾

4.5.2.1 Ultraestrutura do Ciclo Ovidutal

Infundíbulo posterior: o epitélio desta região do oviduto é semelhante ao observado nas espécies ovíparas descritas anteriormente, o qual é composto por células ciliadas e células secretoras (Figura 48A). Durante outono e início do inverno as células secretoras mostraram núcleo achatado com cromatina condensada e vacúolos eletrolucentes na porção apical da célula (Figura 48A). As células ciliadas se caracterizam por núcleo arredondado ou oval com aglomerados de mitocôndrias na região apical da célula, vacúolos supranucleares e corpúsculos basais que dão origem aos cílios (Figura 48B). Durante essas estações os canalículos intercelulares são proeminentes e conferem um formato de célula “murcha” quando comparadas as demais estações do ano (Figura 48B). Durante a primavera, o epitélio infundibular pode apresentar um padrão ativo ou de quiescência, o qual sugere um ciclo bienal para essa espécie. Em animais que saíram de uma gestação recente o epitélio se caracteriza por células baixas com núcleo alongado de formato irregular, perda de cílios e endocitose (Figura 48C). Já animais em vitelogênese secundária (primavera-verão) apresentam células secretoras com produção de vacúolos eletrodensos espalhados em todo o citoplasma e liberados por secreção merócrina (Figura 48D). As células secretoras mostram um aumento do transporte vesicular e são observadas organelas como AG, RER, REL e mitocôndrias (Figura 48E, F). Dentro do infundíbulo também são encontradas glândulas tubulares constituídas principalmente por células ciliadas e escassas células secretoras como descrito para as três espécies anteriores.

Útero: esta região ovidutal ocorre após o infundíbulo posterior em *T. dorsatus* (espécie vivípara) e exibe algumas diferenças em relação às demais espécies estudadas. O epitélio desta espécie vivípara se caracteriza por um aumento considerado de capilares uterinos na lâmina própria, se comparadas às espécies vivíparas (Figura 49A). O epitélio uterino é constituído por células ciliadas e secretoras, das quais esta última possui microvilos na borda luminal da célula (Figura 49B). Em espécimes em vitelogênese primária, as células secretoras apresentam um formato cubóide e produzem vacúolos eletrolucentes que são observados na porção apical da célula (Figura 49B). Durante essa fase, as organelas encontradas em abundância são as mitocôndrias que são observadas aglomeradas na porção central da célula (Figura 49B). Já em

fêmeas em vitelogênese secundária ou prenhes, as células secretoras exibem um formato colunar com vacúolos eletrodensos espalhados em todo o citoplasma (Figura 49C). Em fêmeas prenhes, as células ciliadas das câmaras uterinas (Figuras 9A e 49D) sofrem atrofia quando comparadas as regiões entre as câmaras (constrições) (Figura 49E). Outra diferença observada entre o útero das espécies ovíparas e da espécie vivípara aqui estudada é a composição citoplasmática das células que constituem as glândulas uterinas. Em *T. dorsatus* essas células possuem elevado número de mitocôndrias no citoplasma, já as ovíparas possuem RER (proteínas) bem desenvolvido durante a maior parte do ciclo (Figura 49F).

Junção útero-vaginal (JUV): o epitélio da JUV apresenta o mesmo padrão que o descrito para as espécies ovíparas, caracterizado por uma maior concentração de células ciliadas em relação às células secretoras (Figura 50A). A borda apical das células ciliadas é composta por cílios e estereocílios, já as células secretoras por microvilos (Figuras 50A, B). A atividade secretora se manteve constante durante o ano todo, a qual se caracterizou por vacúolos eletrolucentes liberados tanto por secreção apócrina como merócrina (Figuras 50A, C). Unicamente fêmeas gestantes apresentaram vacúolos eletrolucentes e eletrodensos misturados no citoplasma da célula (Figura 50D).

Vagina: é caracterizada pela atividade secretora constante de vacúolos eletrolucentes associados à eletrodensos durante a maioria das estações do ano. O epitélio vaginal de *T. dorsatus* é composto por células colunares secretoras e poucas células ciliadas (Figura 50E). As células secretoras possuem um núcleo basal eucromático e vacúolos secretores que ocupam $\frac{3}{4}$ do citoplasma da célula (Figura 50E). Espécimes em vitelogênese secundária e gestantes (primavera, verão e outono) mostraram vacúolos eletrolucentes associados à eletrodensos (Figura 50E). Contudo, animais pós-parto (final do outono-inverno) apresentaram um epitélio com liberação de material epitelial por secreção holócrina (Figura 50F). A eliminação desse epitélio após a gestação indica que este é renovado completamente a cada ciclo reprodutivo.

Figura 48 – Ultraestrutura do epitélio infundibular em *Tomodon dorsatus* durante o ciclo reprodutivo

(A) Epitélio infundibular com vacúolos eletrolucentes durante outono-inverno (B) Células ciliadas com núcleo basal e vacúolos supranucleares (C) Epitélio infundibular em animal pós-parto. Inseto: endocitose de vesícula luminal (D) Células secretoras em espécimes em vitelogênese secundária durante primavera-verão. (E e F) Citoplasma de célula secretora durante fase ativa. AG: Aparelho de Golgi; Cb: corpúsculo basal; Cc: células ciliadas; Ci: cílios; cin: canalículo intercelular; Cs: células secretoras; dm: desmossomo; ec: eucromatina; fcis: face cis; ftr: face trans; hc: heterocromatina; L: lúmen; lb: lâmina basal; m: mitocôndrias; mv: micróvilos; N: núcleo; RER: Retículo endoplasmático rugoso; REL: Retículo endoplasmático liso; sm: secreção merócrina; v: vacúolo; ve: vesícula; Vse (d): vacúolos secretores eletrodensos; Vse (l): vacúolos secretores eletrolucentes; ZA: zônula de adesão; Zo: zônula de oclusão; cabeça de seta branca (invaginações da membrana)

Fonte: Rojas (2013)

Figura 49 -. Ultraestrutura do epitélio e glândulas uterinas em *Tomodon dorsatus* em diferentes estágios reprodutivos

(A) Epitélio uterino de fêmea com capilares aumentados na lâmina própria. (B) Célula secretora de fêmea em vitelogênese primária com vacúolos eletrolucentes na porção apical. (C) Célula secretora de fêmea em vitelogênese secundária (D) MEV do epitélio luminal da câmara uterina incubatória durante a gestação (E) MEV das região inter-câmara com abundantes cílios. (F) Citoplasma da célula da glândula uterina com elevado número de mitocôndrias. cau: capilar uterino; Cb: corpúsculo basal; Cc: células ciliadas; Ci: cílios; cm: cristas mitocondriais; Cs: células secretoras; dm: desmossomo; em: envoltório nuclear; eu: eucromatina; hc: heterocromatina; hn: hemácias nucleadas; L: lúmen; m: mitocôndrias; me: membrana externa; mv: microvilos; N: núcleo; nc: núcleo do capilar; so: secreção ovitotal; Vse(d): vacúolos secretores eletrodensos; Vse(l): vacúolos secretores eletrolucentes; ZO: zônula de oclusão

Fonte: Rojas (2013)

Figura 50 – Microscopia eletrônica de transmissão da junção útero-vaginal e vagina em *Tomodon dorsatus*

(A) Epitêlio luminal da JUV com abundantes células ciliadas e secreção merócrina. (B) Cílios e estereocílios na borda apical do das células ciliadas. (C) Vacúolos eletrolucentes liberados por secreção apócrina. (D) Vacúolos secretores eletrolucentes e eletrodensos numa fêmea durante a gestação. (E) Células secretoras do epitêlio vaginal. Inserto: núcleo eucromático. (F) Epitêlio vaginal de fêmea pós-parto. Cb: corpúsculo basal; Cc: células ciliadas; Ci: cílios; cin: canalículos intercelulares; Cs: célula secretora; dm: desmosomo; E: estereocílios; ec: eucromatina; em: envoltório nuclear; hc: heterocromatina; L: lúmen; lb: lâmina basal; m: mitocôndrias; mv: microvilos; N: núcleo; sa: secreção apócrina; sm: secreção merócrina; sh: secreção holócrina; Vse (l): vacúolos secretores eletrolucentes; Vse (l+d): vacúolos secretores eletrolucentes e eletrodensos; ZA: zônula de adesão; ZO: zônula de oclusão

Fonte: Rojas (2013)

4.6 RESULTADOS GERAIS

4.6.1 Anatomia ovidutal

- Macroscopicamente o oviduto das quatro espécies investigadas apresenta um padrão assimétrico, com o lado direito maior e mais cranial que o esquerdo;
- O trato reprodutor das espécies estudadas apresenta as mesmas características microscópicas, que dividem o oviduto (sentido crânio-caudal) em: infundíbulo (anterior e posterior), útero, junção útero-vaginal e vagina;
- Fêmeas de *T. dorsatus* apresentam placenta corioalantóica durante a gestação ou prenhez;
- A vagina de *O. guibei*, *P. patagoniensis* e *L. miliaris* é fundida a cloaca é por isso não é visível a olho nu, já em *T. dorsatus* a vagina é parcialmente bilobada e observável macroscopicamente.

4.6.2 Ciclo ovidutal

- O epitélio ovidutal é constituído em toda sua extensão por células ciliadas entremeadas com células secretoras, as quais produzem grânulos ricos em carboidratos neutros e glicosaminoglicanos carboxilados durante grande parte do ano;
- O aumento da atividade secretora do epitélio ovidutal e das glândulas uterinas em fêmeas vitelogênicas sugere que essa atividade permaneça sobre influência hormonal;
- A principal organela observada nas células das glândulas uterinas das serpentes ovíparas foi o RER, já em *T. dorsatus* foram as mitocôndrias;
- A eletrodensidade dos vacúolos citoplasmáticos produzidos pelo epitélio ovidutal durante o ciclo reprodutivo é dependente da atividade folicular ovariana, já que fêmeas

vitelogênicas apresentam em sua maioria vacúolos citoplasmáticos eletrodensos e fêmeas pré-vitelogênicas vacúolos eletrolucentes;

- Fêmeas vivíparas de *T. dorsatus* apresentam uma maior vascularização uterina durante a gestação, se comparadas às espécies ovíparas no mesmo estágio reprodutivo.

4.6.3 Estocagem de esperma

- *L. miliaris*, *O. guibei* e *P. patagoniensis* possuem glândulas túbulo alveolares ramificadas no infundíbulo posterior capazes de estocar esperma por tempo indeterminado;

- *T. dorsatus* apresenta estruturas morfológicamente semelhantes aos receptáculos de esperma no infundíbulo posterior, porém, a ausência de esperma impede confirmar essa função;

- No infundíbulo posterior de *L. miliaris*, *O. guibei* e *P. patagoniensis* a estocagem de esperma por curto tempo ocorre nas glândulas tubulares ciliadas, já o armazenamento de gametas por longos períodos é observado nos receptáculos de esperma;

- As glândulas tubulares ciliadas descritas no infundíbulo posterior de *O. guibei* têm a capacidade de fagocitar espermatozóides durante o ciclo reprodutivo;

- Durante o processo de estocagem de esperma as células secretoras dos receptáculos aumentam a produção de carboidratos neutros, o que sugere uma função de nutrição dos gametas durante esse período;

- O presente estudo é o primeiro a descrever receptáculos de esperma no infundíbulo posterior em serpentes neotropicais;

- *T. dorsatus* e *P. patagoniensis* tem capacidade de estocar esperma na JUV, entretanto, unicamente na segunda espécie foi evidenciado esperma após ovipostura;

- A estocagem de gametas masculinos na região infundibular acontece independentemente da região que essas serpentes habitam.

4.6.4 Ciclos reprodutivos

- Diferenças na estação de acasalamento entre as populações de *L. miliaris* sugerem influência da temperatura; já variações entre os ciclos reprodutivos nas populações de *P. patagoniensis* parecem estar ligadas a pluviosidade;
- O ciclo reprodutivo de *O. guibei* do Sudeste e Nordeste do Brasil não sofre influência do clima sendo caracterizado como sazonal de reprodução estendida para ambas as populações;
- *T. dorsatus* não apresenta diferença nos traços reprodutivos entre as populações do Sul e Sudeste, assim esse padrão é influenciado pela inércia filogenética.

5 DISCUSSÃO

5.1 ANATOMIA MACRO E MICROSCÓPICA DO OVIDUTO

De acordo com o presente estudo, o oviduto das quatro espécies estudadas mostrou pequenas diferenças em relação às demais descrições existentes na literatura (BLACKBURN, 1998; GIRLING, 2002; SIEGEL et al., 2011). Na maioria das espécies estudadas foi observado um padrão assimétrico caracterizado por um oviduto direito (maior) mais cranial e um esquerdo (menor) mais caudal. Esse padrão macroscópico é observado comumente na maioria das serpentes, porém, essa assimetria pode variar dependendo da espécie em questão (BLACKBURN, 1998; GIRLING, 2002; SIEGEL et al., 2011). Segundo Perkins e Palmer (1996) a diferença do comprimento de cada oviduto, tem por objetivo otimizar o espaço na cavidade celomática durante a gravidez ou gestação. Em lagartos essa assimetria é pouca acentuada, no entanto, algumas espécies que apresentam o corpo alongado podem ter uma maior assimetria (BLACKBURN, 1998). Na literatura existem algumas descrições de espécies de Squamata que perderam o oviduto esquerdo como é o caso dos lagartos *Anniella pulchra* (COE; KUNHEL, 1904) e *Lipinia rouxi* (GREER, 1976). Em serpentes, o oviduto esquerdo é degenerado ou ausente em algumas espécies de *Tantilla* (CLARK, 1970; ALDRIDGE, 1992), em serpentes das famílias Typhlopidae e Leptotyphlopidae (ROBB, 1960; FOX, DESSAUER, 1962), e em duas espécies de Anomalepididae (ROBB; SMITH, 1966). Entretanto, lagartos e serpentes que apresentam um único oviduto, ambos os ovários são funcionais (COE; KUNKEL, 1904; CLARK, 1970; GREER, 1976; ALDRIDGE; SEMLICHT, 1992).

O oviduto apresenta diversas nomenclaturas com relação a suas divisões anatômicas, descritas por diferentes autores (SIEGEL et al., 2011). A utilização de uma nomenclatura correta está baseada unicamente no estudo histológico de todo oviduto com objetivo de diferenciar as regiões contidas nele (BLACKBURN, 1998). Assim, o uso de termos anatômicos equivalentes baseados numa comparação visual macroscópica deve ser tomado com precaução (BLACKBURN, 1998).

Recentemente, Siegel et al. (2011) sugerem uma nova nomenclatura ovidutal baseada no trato reprodutor de *Nerodia sipedon* e *Agkistrodon piscivorus*. Segundo esses autores, o oviduto apresenta cinco regiões diferentes nele contidas (no sentido caudo-cranial): bolsa (conhecida por outros autores como divertículo de Giacomini, vagina, urodeu anterior ou bolsa vaginal), útero não glandular, útero glandular e infundíbulo (anterior e posterior). Em viperídeos estudados até hoje, é fácil de diferenciar macroscopicamente a bolsa (vagina) das outras porções ovidutais (ALMEIDA-SANTOS, 2005; SIEGEL; SEVER, 2008a, b; SIEGEL et al., 2011). No entanto, isso não ocorre em *L. miliaris*, *O. guibei* e *P. patagoniensis*, onde a bolsa vaginal ou vagina se encontra fundida a cloaca e não é visível a olho nu, já em *T. dorsatus* essa bolsa é parcialmente bifurcada. Cope (1898) observou que a região do divertículo de Giacomini (vagina) não é bifurcada em serpentes da família Boidae, Erycidae, Phytonidae e Scolecophidae. Contudo, variações dessa estrutura em serpentes podem estar diretamente ligadas ao formato do hemipênis do macho (COPE, 1898; POPE, 1941). Até hoje, a origem embriológica da vagina é controversa, assim alguns autores sugerem que essa estrutura seja derivada dos ductos de Muller (SAINT-GIRONS, 1957; BLACKBURN, 1998; SIEGEL; SEVER, 2008b) e outros que ela faz parte da cloaca (GIACOMINI, 1893; GABE; SAINT-GIRONS, 1965; SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2007).

Microscopicamente, a divisão ovidutal das espécies investigadas difere da apresentada por Siegel et al. (2011). No presente estudo, a região conhecida como bolsa foi descrita aqui como vagina, e é microscopicamente semelhante nas quatro espécies. Histologicamente a vagina mostrou as mesmas características descritas para a maioria das espécies estudadas até hoje. A vagina possui uma mucosa alta constituída por aglomerados de células mastócitos, cílios esparsos e epitélio com células colunares (SIEGEL et al., 2011). Essas células secretoras produzem carboidratos neutros e muco ácido de forma uniforme durante o ciclo reprodutivo (GABE; SAINT-GIRONS, 1965; URIBE et al., 1998; SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2007; SIEGEL et al., 2011).

Posicionada cranialmente a vagina, encontra-se a Junção útero-vaginal (JUV), a qual recebeu diferentes nomes durante a evolução dos estudos do trato reprodutor feminino em serpentes. Esta região ovidutal já foi chamada de vagina (GIERSBERG, 1922; HOFFMAN; WIMSATT, 1972; BAUMAN; METTER, 1977; PERKINS; PALMER, 1996; BLACKBURN, 1998; URIBE et al., 1998; SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2007), “porzione terminale”

(GIACOMINI, 1893), vagina anterior (FOX, 1956; HALPERT et al., 1982), útero posterior (ALDRIDGE, 1992; ALMEIDA-SANTOS, SALOMÃO, 1997), útero não glandular (SIEGEL; SEVER, 2006, 2008a,b; SIEGEL et al., 2011) entre outros.

A mais recente nomenclatura proposta por Siegel et al. (2011) de chamar a JUV de útero não glandular, não condiz com a etimologia da palavra útero. O termo útero não pode ser aplicado para essa região do oviduto, já que a palavra útero (latin *uterus*) deriva de *uter* (= odre feito de pele de animal, usado para transportar líquidos ou, inflado, como bóia para a travessia de rios). Plínio foi quem utilizou inicialmente esse termo, devido à semelhança no formato principalmente em útero gravídico (FERNANDES, 1999). As serpentes estudadas aqui, tanto ovíparas (*L. miliaris*, *O. guibei*, *P. patagoniensis*) como vivípara (*T. dorsatus*), não apresentam gravidez ou gestação nessa região ovidutal a qual é desprovida de glândulas. Assim, o presente trabalho caracterizou e denominou essa região como JUV e não como útero, já que ele não recebe os ovos ou embriões durante a gravidez ou gestação.

A JUV foi identificada em todos os táxons estudados até hoje, e se caracteriza morfológicamente de maneira semelhante, com camada muscular bem desenvolvida com pregas longas e sulcos profundos (BLACKBURN, 1998; GIRLING, 2002; SIEGEL et al., 2011). A lâmina própria da JUV das quatro espécies investigadas apresentou concentrações elevadas de células mastócitos, como descrito na literatura (SAINT-GIRONS, 1957; PERKINS; PALMER, 1996; URIBE et al., 1998; SIEGEL, SEVER, 2008a), embora não como observado na vagina. O epitélio da JUV é composto comumente por células secretoras entremeadas com células ciliadas (FOX, 1956; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; URIBE et al., 1998; SEVER et al., 2000; SIEGEL; SEVER, 2008a, b; ROJAS, 2009). No entanto, as células secretoras não são encontradas em todas as espécies (GIERSBERG, 1922; FOX; DESSAUER, 1962).

Nos táxons investigados, a natureza da secreção (células secretoras) é composta por carboidratos neutros e muco ácido. Esse padrão secretor coincide com o descrito para *Diadophis punctatus* (PERKINS; PALMER, 1996), *Seminatrix pygaea* (SEVER et al., 2000) e algumas serpentes do gênero *Thamnophis* (FOX, 1956; HALPERT et al., 1982). Nas quatro espécies estudadas foi possível observar que as células ciliadas são mais abundantes que as células secretoras, padrão já descrito para outras serpentes (SEVER et al., 2000; GIRLING, 2002; SIEGEL et al., 2011). Segundo Girling (2002) as células ciliadas podem auxiliar no transporte de esperma ou movimentação de muco e debris celulares dentro do oviduto. A descrição de um

epitélio luminal pseudo-estratificado para *L. miliaris*, *O. guibei*, *P. patagoniensis* e *T. dorsatus* é semelhante ao observado em *Tantilla coronata* (ALDRIDGE, 1992).

A JUV apresenta três funções importantes no trato reprodutor feminino das serpentes: (1) é o local que serve de canal por onde os ovos ou fetos são expelidos (BLACKBURN, 1998), (2) região onde acontece estocagem de esperma (BLACKBURN, 1998; ROJAS, 2009; ALMEIDA-SANTOS, 2005; BARROS et al., 2012) e (3) funciona como um esfíncter durante a gravidez ou gestação (BOTTE, 1973b; GIRLING et al., 1997). Cuellar (1966) sugere que as pregas longas são necessárias para aumentar a área de superfície da mucosa, o que auxiliaria durante a oviposição ou parturição. De acordo com os cortes histológicos analisados em diferentes estações do ano, as quatro espécies apresentam esperma dentro dos sulcos da JUV. No entanto, unicamente fêmeas de *P. patagoniensis* exibiram esperma dentro dos sulcos após ovipostura, o qual confirma estocagem de gametas e não esperma remanescente de um acasalamento anterior ou recente (discutido em detalhes na secção 5.2).

Após a JUV (sentido caudo-cranial) pode ser encontrado o útero, que em alguns táxons é levemente pregueado quando observado a olho nu (SEVER et al., 2000; SIEGEL et al., 2011). Unicamente *L. miliaris* apresentou um útero altamente pregueado durante todas as estações do ano se comparado as demais espécies. Isso caracteriza um padrão morfológico permanente e não temporário. Assim, a utilização do oviduto pregueado como parâmetro na determinação da maturidade sexual como utilizado para diversas espécies (SHINE, 1977a; PIZZATTO; MARQUEZ, 2006; BARROS et al., 2012) não pode ser aplicado para *L. miliaris*. O útero apresenta inúmeras denominações sugeridas por diferentes autores, contudo, o termo útero é o mais utilizado entre as espécies descritas (GIACOMINI, 1893; GIERBERG, 1922; SAINT-GIRONS, 1957; BLACKBURN, 1998; GIRLING, 2002). Esta região ovidutal também já foi chamada de “partie inferieure” (SACCHI, 1888), útero anterior (ALDRIDGE, 1992) e recentemente de útero glandular (SIEGEL et al., 2011).

Em serpentes ovíparas, o útero é responsável pelo desenvolvimento dos ovos antes da ovipostura, assim como pela formação das membranas da casca do ovo (JACOBI, 1936). Nas espécies vivíparas, o desenvolvimento fetal é completado dentro do útero, o qual contribui para formação da placenta que sustenta o feto (BLACKBURN, 1998). Existem algumas diferenças anatômicas entre o útero e as demais regiões do oviduto, assim como também entre o modo reprodutivo das espécies estudadas. Em algumas serpentes das famílias Colubridae, Natricidae,

Viperidae e Elapidae, as camadas musculares do útero (longitudinal e circular) são mais finas se comparadas a JUV, porém, a lâmina própria uterina é levemente mais grossa (KASTURIRANGAN, 1951a,b; SAINT-GIRONS, 1957; BAUMAN; METTER, 1977; MEAD et al., 1981; SEVER et al., 2000). O padrão observado para essas espécies ocorre também para *L. miliaris*, *O. guibei*, *T. dorsatus* e *P. patagoniensis*.

Em serpentes, o útero é constituído por invaginações glandulares dentro da lâmina própria (glândulas uterinas), que variam quanto ao formato, tamanho, densidade e atividade secretora. Essas glândulas podem ser classificadas como: tubular (*Cerastes cerastes*, *Crotalus viridis*, *Natrix natrix*, *Vipera aspis*), túbulo alveolar ramificada (*Thamnophis sirtalis*), alveolar composta (*Tantilla coronata*) e tubular simples ou ramificada (*Agkistrodon piscivorus*, *Seminatrix pygaea*) (SIEGEL et al., 2011). Nas espécies investigadas, as glândulas uterinas são do tipo tubular simples ramificada, porém, essa ramificação é mais forte nas ovíparas se comparadas a *T. dorsatus*. Em relação ao tamanho, *O. guibei* mostrou a maior glândula uterina entre as espécies ovíparas durante a fase ativa ou secretora. No entanto, a glândula uterina de *T. dorsatus* foi a que apresentou maior tamanho na fase ativa se comparadas às outras três espécies. A relação de densidade, determinada por comparação visual, também foi diferente entre as ovíparas e *T. dorsatus*. Nas ovíparas a distância entre uma glândula e outra parece ser bem menor que em *T. dorsatus*. Esse padrão de densidade entre ovíparas e vivíparas é comum entre as serpentes (GIACOMINI, 1893; BLACKBURN, 1998; SIEGEL et al., 2011). Nas quatro espécies o útero é constituído principalmente por fibras de colágeno do tipo I (laranjas), as quais são encontradas em abundância em tecidos de elevada resistência a tensão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Esse tipo de fibras localizadas na porção uterina é muito importante, já que durante a gravidez ou gestação o útero aumenta bastante em tamanho.

Nos Squamata, as glândulas uterinas cheias de grânulos secretores são conhecidas pelo desenvolvimento da membrana da casca (GIACOMINI, 1893; BOTTE, 1973b; GUILLETTE et al., 1989; PERKINS; PALMER, 1996; HEULIN et al., 2005). As análises histoquímicas nas espécies investigadas demonstraram negatividade para PAS, AB e ABr nas diferentes estações do ano. Entretanto, as espécies ovíparas apresentaram uma elevada atividade citoplasmática do RER, enquanto as vivíparas um aumento da atividade mitocondrial quando observadas pela MET (discutido na secção 5.4). O aumento do RER nas células das glândulas uterinas (ovípara) sugere uma produção de proteínas responsáveis pelas fibras protéicas que formam a membrana da casca.

A reação negativa para ABr indicou que as proteínas produzidas pelas glândulas não reagem com esse corante e talvez a utilização de uma técnica de imunohistoquímica seja mais adequada na detecção de proteínas específicas.

Alguns autores sugerem também que o epitélio infundibular e uterino participam da formação das membranas da casca secretando mucopolissacarídeos ácidos e glicoproteínas (HOFFMAN, 1970; CORSO et al., 1988). O epitélio infundibular e uterino de fêmeas em vitelogênese secundária (quatro espécies) mostraram uma positividade de moderada a forte para PAS e AB. Isso sugere também a participação dos grânulos secretores epiteliais e glandulares na produção da membrana da casca.

Outra característica observada no útero de *T. dorsatus* foi uma lâmina própria muito vascularizada se comparadas às espécies ovíparas. No final da gestação o útero torna-se hipervascularizado, o qual é de grande importância na troca materno fetal de gás e nutrientes. Várias pesquisas em Squamata tem notado que o útero aumenta consideravelmente a sua vascularização durante a gestação (GIACOMINI, 1891; JACOBI, 1936; HOFFMAN, 1970; BLACKBURN, 1985b; GIRLING, 2002; SIEGEL et al., 2011).

Entre os táxons investigados unicamente *T. dorsatus* apresentou o modo reprodutivo de viviparidade caracterizado por uma gestação extensa e formação de placenta corioalantóide. Uma das características consideradas essenciais na evolução da viviparidade é sem dúvida a formação da placenta, a qual é definida como uma aposição ou fusão do tecido parenteral e fetal que permite trocas fisiológicas (MOSSMAN, 1937). Essa associação entre o epitélio coriônico e o epitélio uterino, varia de uma simples aposição celular materno-fetal, até formas mais complexas com aproximação atenuada de capilares maternos fetais (WOODDING; FLINT, 1994). Durante o início da gestação *T. dorsatus* mostrou bastante vitelo depositado dentro das câmaras incubatórias o que sugere que durante essa fase inicial o embrião seja nutrido por esse vitelo. Isso caracteriza uma nutrição lecitotrófica, na qual os embriões recebem os nutrientes predominantemente do oócito ou ovo liberado após a ovulação. Com a evolução da gestação esse vitelo diminui até desaparecer e dar lugar a uma incipiente placenta corioalantóica. *T. dorsatus* apresenta vestígios da membrana da casca na placenta corioalantóica, como *B. jararaca* e *C. durissus* (ALMEIDA-SANTOS, 2005).

Em Squamata a região mais cranial do oviduto é o infundíbulo, o qual é altamente pregueado, frequentemente translúcido e abre-se na cavidade celomática via óstio infundibular

(PERKINS; PALMER, 1996; SIEGEL et al., 2011). O infundíbulo apresenta uma subdivisão constituída pelo infundíbulo anterior (região pregueada translúcida) e posterior (região pregueada opaca), o qual pode ser observado a olho nú (SIEGEL et al., 2011). Essa subdivisão foi proposta por Siegel et al. (2011) e constitui a terminologia usada neste estudo em referência ao infundíbulo.

A porção anterior do infundíbulo já foi chamada de *portion superieure* (holandês = porção superior) (SACCHI, 1888), *imbuto* (italiano = funil) (GIACOMINI, 1893), *trichters* (alemão = funil) (GIERSBERG, 1922), região do funil (KASTURIRANGAN, 1951a, b) e infundíbulo cranial (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997). Porém, a designação exclusiva de “infundíbulo” é a mais utilizada hoje pela maioria dos autores (SIEGEL et al., 2011). O infundíbulo anterior é composto pelo óstio infundibular que funciona no oviduto como porta de entrada para o oócito ovulado. No entanto, antes da ovulação o infundíbulo migra em direção ao ovário onde o óstio envolve o oócito em desenvolvimento (GIRLING, 2002). Esse processo tem sido observado em vários Squamata que apresentam um epitélio infundibular formado predominantemente por células ciliadas (GIRLING et al., 1997; GIRLING et al., 1998). Girling (2002) sugere que a função das células ciliadas seria a de posicionar o óstio infundibular em volta do oócito. Outra função associada ao epitélio do infundíbulo anterior é a produção de mucopolissacarídeos ácidos e glicoproteínas pelas células secretoras (HOFFMAN, 1970). Essa secreção teria por função iniciar a formação da membrana da casca em espécies ovíparas (HOFFMAN, 1970). No entanto, essa hipótese não pode ser aplicada para *L. miliaris*, *O. guibei* e *P. patagoniensis*, devido a que anatomicamente, os receptáculos de esperma (infundíbulo posterior) ficam posteriores ao infundíbulo anterior. Assim, a deposição de material secretório envolta do oócito constituiria uma barreira física no momento da fertilização. Segundo Blackburn (1998) o esperma não pode penetrar a membrana da casca e se presume que a fertilização ocorra antes da deposição desse material, como ocorre em quelônios (GIST; JONES, 1989) e aves (BASKT; BAHR, 1993).

Caudal ao infundíbulo anterior encontra-se o posterior, que nas espécies estudadas é a região mais especializada do oviduto. Isso se deve em parte a presença de glândulas tubulares infundibulares (ciliadas) e glândulas túbulo alveolares ramificadas denominadas de receptáculos de esperma. O primeiro tipo de glândula é formado por invaginações do próprio epitélio infundibular, já que são compostas principalmente por células ciliadas e algumas células

secretoras não ciliadas. Fox (1956) foi o primeiro autor a descrever a estocagem de esperma em serpentes do gênero *Thamnophis*. Nesse estudo o autor descreveu os dois tipos de glândulas citadas aqui, porém Fox (1956) observou uma conexão entre as glândulas ciliadas e os receptáculos de esperma. Nos táxons investigados aqui, essa conexão não existe e as glândulas tubulares ciliadas ocorrem anteriores aos receptáculos de esperma. A função dessas glândulas segundo Fox (1956), seria a de guiar os espermatozóides até os receptáculos por meio de uma corrente contrária no lúmen ovidutal. Os cílios presentes nas glândulas tubulares seriam os responsáveis por produzir a corrente para que os espermatozóides nadassem contra ela, até localizar os alvéolos. Segundo Fox (1956), essa hipótese poderia ser explicada pela organização paralela dos espermatozóides dentro dos receptáculos.

Entre os receptáculos de esperma o tecido encontrado é constituído principalmente por fibras de colágeno do tipo I (laranja) e tipo III (verdes). A função de ambos os tipos de fibras é manter a estrutura e forma do tecido, porém as fibras reticulares são mais finas e apresentam menos birrefringência (moléculas orientadas em uma só direção que têm capacidade de brilhar no escuro quando observadas por microscopia de polarização) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). As fibras do tipo I são numerosas no tecido conjuntivo e se organizam paralelamente umas as outras formando feixes de colágeno, já as reticulares são responsáveis por ligar um determinado tecido a outro (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Com relação ao epitélio infundibular, o padrão de células ciliadas entremeadas com células não ciliadas secretoras observado aqui, já foi descrito em inúmeras espécies de Squamata (HOFFMAN; WIMSATT, 1972; GIRLING et al., 1997; BLACKBURN, 1998; GIRLING, 2002; SIEGEL; SEVER, 2008a). As células do epitélio de formato simples prismático a cubóide, também foram reportadas em colubrídeos como *Coniophanes fissidens* (Xenodontinae) (SIEGEL et al., 2011), *Nerodia sipedon* (Natricinae), *Tantilla coronata* (Colubrinae) (ALDRIDGE, 1992), e em diversas espécies de escolecofídeos (FOX; DESSAUER, 1962). A secreção de carboidratos neutros e glicosaminoglicanos carboxilados durante o ano todo pelo epitélio infundibular, indicam uma produção constante de muco. Esse produto (muco) pode atuar como lubrificante e como barreira impedindo a entrada de microorganismos invasores (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Anatomicamente, o oviduto foi bem semelhante nas espécies estudadas, com algumas diferenças principalmente relacionadas ao modo ovíparo e vivíparo. No entanto, a falta de

estudos morfofuncionais do trato reprodutor feminino principalmente das espécies neotropicais torna difícil o entendimento da evolução ou surgimento de estruturas dentro do próprio oviduto. Futuros estudos focados nessas variações morfofuncionais associados a história natural das espécies ajudarão a compreender o processo como um todo, assim como também auxiliarão em responder questões filogenéticas.

5.2 ESTOCAGEM DE ESPERMA

A capacidade de estocar esperma no oviduto em répteis é bem conhecida e permite que fêmeas se reproduzam em ausência do macho (BLACKBURN, 1998). Isso confere as fêmeas um aumento da flexibilidade geográfica e temporal, assim como fertilização de inúmeros folículos sem sucessivo acasalamento (BLACKBURN, 1998). Em algumas espécies, o armazenamento de gametas pode ser um componente obrigatório em razão de ciclos reprodutivos assíncronicos de machos e fêmeas (BIRKHEAD; MOLLER, 1993). Em *L. miliaris*, *O. guibei* e *P. patagoniensis*, a estocagem de esperma é um componente obrigatório do ciclo reprodutivo, caracterizado em algumas populações pela época de acasalamento dissociada da ovulação. Em *T. dorsatus* a estação da cópula é associada à vitelogênese secundária (estágio final) e ovulação, assim a estocagem não seria um componente obrigatório do ciclo. No entanto, o presente estudo conseguiu observar RE (vazios) e estocagem de gametas na JUV durante outono-inverno. Isso indica que *T. dorsatus* apresenta estruturas capazes de armazenar esperma, porém, o uso dessa estratégia reprodutiva parece ser influenciado por fatores externos.

Em serpentes existem dois maiores sítios de armazenamento de gametas, o infundíbulo posterior e o oviduto posterior (neste estudo JUV) (FOX, 1956; HOFFMAN; WIMSATT, 1972; HALPERT et al., 1982; ALDRIDGE, 1992; PERKINS, PALMER, 1996; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; SEVER; RYAN, 1999; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; SIEGEL; SEVER, 2006; SIEGEL; SEVER, 2008a). Em *L. miliaris* e *O. guibei* a estocagem ocorreu unicamente no infundíbulo posterior, já em *P. patagoniensis*, tanto no infundíbulo como na JUV. Em *T. dorsatus* essa estratégia reprodutiva foi observada na JUV e sugere-se essa função na região infundibular.

Na maioria das espécies, após a cópula os receptáculos de esperma são preenchidos rapidamente pelos gametas (FOX, 1956; HOFFMAN; WIMSATT, 1972; ROJAS, 2009). Siegel et al. (2011) sugere que essa ascensão rápida do esperma aconteceria em função da produção de grânulos ricos em carboidratos neutros, que atrairia o esperma para os receptáculos (SIEGEL et al., 2011). No entanto, outros autores sugerem que esse papel seja realizado pelos cílios observados nas glândulas tubulares do infundíbulo (FOX, 1956; HOFFMAN; WIMSATT, 1972). Em *S. pygaea*, as células secretoras na porção terminal do receptáculo não apresentam atividade durante a estocagem e os núcleos dos espermatozóides são observados em direção a abertura da glândula (SEVER; RYAN, 1999). Isso dá a entender que os gametas poderiam sobreviver por longos períodos na ausência de carboidratos neutros. Hoffman e Wimsatt (1972) sugerem que a viabilidade do esperma nos receptáculos poderia também ser mantida por lipídeos.

Em *O. guibei*, *P. patagoniensis* e *L. miliaris* a atração do esperma por carboidratos neutros parece ser uma forte hipótese. Isso porque as análises histoquímicas pelo PAS nos RE indicaram uma positividade forte na presença de gametas. Porém, os cílios também teriam uma participação nesse processo, pelo fato de ser observado esperma nas glândulas ciliadas unicamente logo após cópula. A permanência do esperma nas glândulas ciliadas parece ocorrer por curto tempo. Assim, o presente estudo propõe classificar as glândulas ciliadas como glândulas de estocagem por curto período e os receptáculos como glândulas de estocagem por longo período.

A porção terminal dos receptáculos ou alvéolos é composta inteiramente por células secretoras em todos os táxons estudados até hoje (FOX, 1956; FOX; DESSAUER, 1962; HOFFMAN; WIMSATT, 1972; PERKINS; PALMER, 1996; SIEGEL; SEVER, 2008a, b). Porém, existem algumas exceções como *Vipera aspis* (SAINT-GIRONS, 1957) e *Seminatrix pygaea* (SEVER; RYAN, 1999). Nas duas primeiras espécies os RE foram descritos como uniformemente ciliados, já em *S. pygaea* não é diferenciado do epitélio luminal (constituído por células secretoras e ciliadas). Esse padrão é diferente do observado para as espécies investigadas, onde morfologicamente os RE possuem um epitélio secretor simples pavimentoso a cubóide, associado a alguns tufo de cílios.

As células secretoras descritas nos RE de *T. sirtalis* (HOFFMAN; WIMSATT, 1972), *T. coronata* (ALDRIDGE, 1992), *D. punctatus* (PERKINS; PALMER, 1996), *S. pygaeae* (SEVER; RYAN, 1999) e *A. piscivorus* (SIEGEL; SEVER, 2008a) coram positivamente para

PAS (carboidratos neutros). Essa positividade também foi observada para as quatro espécies investigadas ocorrendo uma maior atividade secretora na presença de gametas. Isso sugere que essa secreção poderia nutrir o esperma durante sua estadia dentro dos RE.

Fêmeas de *L. miliaris* e *O. guibei* (ambas do Sul do Brasil) com ovos e após a ovipostura apresentaram esperma estocado no RE. Isso confirma a hipótese de que os RE não são utilizados unicamente para uma estação reprodutiva e sim para várias, o qual confere uma imensa vantagem reprodutiva para a fêmea. Segundo Pizzatto e Marques (2002) fêmeas de *O. guibei* mantidas em cativeiro apresentaram múltiplas ninhadas no ano, o qual sugere estocagem de esperma. Em *D. punctatus*, *C. cerastes* e *V. aspis* o esperma estocado desaparece dos RE após ovulação ou depois de dois meses (SAINT-GIRONS, 1975; PERKINS; PALMER, 1996). Em *A. piscivorus* e *T. coronata* o esperma permanece estocado por vários meses após a ovulação (inclusive em fêmeas pós-parto em *A. piscivorus*), porém desaparece antes do início da época de acasalamento (ALDRIDGE, 1992; SIEGEL; SEVER, 2008a). Entretanto, é difícil diferenciar se o esperma encontrado nos RE provem de uma cópula recente ou de uma estocagem. Futuros estudos pela MET que enfatizem as mudanças morfológicas na viabilidade dos espermatozóides, talvez possam responder a essa questão. Infelizmente, o presente estudo não conseguiu descrever essa relação celular entre esperma-receptáculo, durante a estocagem para as espécies investigadas.

Dentro dos receptáculos, os espermatozóides são observados de forma geral em um alinhamento paralelo com suas cabeças direcionadas para o epitélio do receptáculo (ROJAS, 2009; SIEGEL et al., 2011). Durante a estocagem de *L. miliaris*, *O. guibei* e *P. patagoniensis* foi descrito contato íntimo do núcleo dos espermatozóides com a porção terminal dos RE. Esse padrão já foi narrado para serpentes das famílias Viperidae, Natricidae e Colubridae (FOX, 1956; HOFFMAN; WIMSATT, 1972; ALDRIDGE, 1992; SEVER; RYAN, 1999; SIEGEL; SEVER, 2008a). Também foram descritos grupos de espermatozóides penetrando nas células secretoras dos RE de *A. piscivorus* (SIEGEL; SEVER, 2008a) e uma possível reabsorção espermática em *T. sirtalis* (HOFFMAN; WIMSATT, 1972). Nas glândulas tubulares ciliadas de *O. guibei* (anteriores aos RE) foi observada fagocitose espermática (espermiofagia) pelas células secretoras, o qual indica a função de reabsorção nessas estruturas (discutido em detalhes na seção 5.4).

Após um determinado tempo de estocagem, o esperma precisa ser liberado pelos receptáculos para fertilizar os oócitos durante a ovulação. Esse processo é um pouco confuso já que a hipótese mais aceita é de que a própria força mecânica da compressão, pela passagem do

oócito, libere os gametas para fertilização. Essa hipótese é baseada na ausência de células mioepiteliais ou qualquer outro tipo de elemento contrátil em volta dos RE (HOFFMAN; WIMSATT, 1972; BLACKBURN, 1998; SEVER; RYAN, 1999; SIEGEL; SEVER, 2008a). Nas espécies investigadas essa hipótese não pode ser aplicada por dois motivos: (1) os quatro táxons apresentaram células mioepiteliais envolvendo os RE e (2) fêmeas com ovos ou que realizaram ovipostura recente mostraram RE preenchidos com esperma. Isso significa que os RE provavelmente liberem os gametas por contração muscular (células mioepiteliais) via estímulo endócrino e não pela força de compressão, a qual expulsaria completamente o esperma dos receptáculos. Assim, com a liberação total de gametas dos RE seria difícil observar esperma estocado em fêmeas grávidas.

Além do infundíbulo posterior a JUV também tem a função de armazenar gametas nas serpentes. A primeira descrição histológica de estocagem na JUV (chamada de vagina anterior) foi realizada em *Crotalus viridis* por Ludwig e Rahn (1943). Nesse estudo os autores observaram unicamente agregação espermática na JUV e ausência de esperma na vagina e útero das fêmeas. Assim eles chegaram à conclusão de que *C. viridis* estocaria esperma por longos períodos no lúmen e dentro de sulcos na JUV. No entanto, Ludwig e Rahn (1943) não examinaram a região infundibular. Outros estudos também notaram a ocorrência de estocagem de esperma nos sulcos da JUV, seja por algumas semanas, durante a hibernação, ou antes de uma subsequente migração infundibular (FOX, 1956; SAINT-GIRONS, 1957; HALPERT et al., 1982; ALDRIDGE, 1992; PERKINS; PALMER, 1996). Almeida-Santos e Salomão (1997) observaram na JUV de *Crotalus durissus* (cascavel) uma nova forma de estocagem conhecida como UMT ou “uterine twisting muscular”. Nessa espécie após o acasalamento no outono, a musculatura da JUV se contrai e estoca o esperma dentro de sulcos durante o inverno até a ovulação na primavera. A estocagem nesse táxon é um componente obrigatório do ciclo reprodutivo e foi descrita também em *Bothrops jararaca* (jararaca) (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; BARROS et al., 2012).

Das fêmeas investigadas, *P. patagoniensis* e *T. dorsatus* mostraram estocagem dentro de sulcos na JUV, porém unicamente na primeira espécie foi confirmada estocagem por longo período. Alguns autores sugerem que o esperma não pode residir nos sulcos após a ovulação, assim eles seriam eliminados ou reabsorvidos (ALDRIDGE, 2002; SIEGEL, SEVER, 2008a; SIEGEL et al., 2011). No entanto, a presença de esperma estocado em fêmeas de *P. patagoniensis* grávidas ou de recente ovipostura sugere o contrário. Segundo Siegel et al. (2011),

a agregação espermática na JUV em algumas serpentes não está associada a uma estrutura ou secreção especializada. Os resultados obtidos para *P. patagoniensis*, indicam o oposto, onde é possível observar um aumento da secreção apical de carboidratos neutros na presença de esperma. Essa estocagem nos sulcos da JUV associada aos receptáculos infundibulares, torna o oviduto de *P. patagoniensis* mais especializado, se comparadas a *O. guibei*, *T. dorsatus* e *L. miliaris*.

A evolução da estocagem de esperma em reptéis é um tópico muito controverso. Até hoje, unicamente dois trabalhos com resultados similares foram realizados (SEVER; HAMLETT, 2002; ECKSTUT et al., 2009). Em ambos os trabalhos, o modo ancestral quanto à localização dos receptáculos de esperma foi determinado como a região infundibular. No entanto, Siegel et al. (2011) sugere uma perda de dados durante essas análises, isso porque os autores utilizaram unicamente receptáculos de esperma, e não incluíram dados sobre agregação espermática prolongada. Segundo Saint-Girons (1975) *Sphenodon punctatus* (tuatara) não possui receptáculos de esperma, porém estoca esperma no lúmen ou possivelmente em sulcos da JUV. Assim, a estocagem na JUV seria uma condição plesiomórfica para Lepidossáurios e a estocagem infundibular teria evoluído de forma secundária e independente nos Squamata.

Nas serpentes estudadas, os RE apresentaram o mesmo padrão de estocagem o qual foi caracterizado pela sua distribuição no infundíbulo posterior. Esse padrão seria o considerado ancestral para as serpentes, porém, a estocagem na JUV em *P. patagoniensis* e *T. dorsatus* poderia caracterizar uma condição plesiomórfica retida, oriunda dos Lepidossáurios. A necessidade de futuras pesquisas sobre a estocagem de esperma em Squamata neotropical, talvez possa responder melhor essa questão. No entanto, os dados apresentados aqui sobre estocagem de esperma em quatro espécies de serpentes neotropicais são inéditos dentro da comunidade herpetológica mundial. Assim, essas informações servirão como ponto de partida para futuros estudos relacionados a estratégias reprodutivas em Squamata.

5.3 CICLO REPRODUTIVO E VARIAÇÃO INTERPOPULACIONAL

5.3.1 *Liophis miliaris* (cobra da água)

O ciclo reprodutivo de *L. miliaris* já foi descrito por Pizzatto e Marques (2006) utilizando somente características macroscópicas, e incluiu populações do Nordeste (Bahia), Sudeste (São Paulo) e Sul (Paraná) do Brasil. Nesse estudo, os autores compararam os ciclos reprodutivos entre as populações e caracterizaram como ciclo contínuo a população do Nordeste e ciclo sazonal as populações do Sul e Sudeste.

No presente estudo, as populações de *L. miliaris* investigadas apresentaram uma distribuição geográfica semelhante ao descrito por Pizzatto e Marques (2006), no entanto, a população do Sul incluiu além do Paraná, os Estados de Rio Grande do Sul e Santa Catarina. De acordo com os resultados obtidos aqui, o ciclo reprodutivo feminino de *L. miliaris* (Sul) é caracterizado como sazonal com folículos vitelogênicos no outono e na primavera. Presença de ovos no final da primavera e início do verão, e estocagem de esperma durante o ano todo. Os folículos vitelogênicos (estágio final) observados no outono sugerem ovulação e produção de ninhadas durante essa estação. Segundo Mathies (2011), a observação de folículos vitelogênicos numa determinada época do ano não é um indicador confiável de iminente ovulação, já que a velocidade de desenvolvimento folicular varia de uma espécie para outra. A capacidade de estocar esperma associado a estágio vitelogênico observado em *L. miliaris* sugere que esta espécie tenha capacidade de ovular e produzir várias ninhadas no mesmo ano.

Embora não tenham sido observados ovos nas fêmeas durante o outono, Di- Bernardo (1998) descreveu indícios de desovas múltiplas durante o ciclo reprodutivo de *L. miliaris* do Sul. Bonfiglio (2007) descreveu a mesma atividade de desova múltipla para *L. semiaureus* da mesma região. A ausência de ovos nas fêmeas dissecadas durante outono pode estar condicionada ao número baixo de espécimes analisados neste estudo. Assim, a probabilidade de múltiplas ninhadas no mesmo ano para *L. miliaris* do Sul pode ser uma realidade.

Os resultados para a população do Sudeste (São Paulo e Minas Gerais) mostraram folículos vitelogênicos principalmente na primavera-verão, porém, também no outono. Ovos

foram observados na primavera, no entanto, uma fêmea grávida no outono sugere duas posturas por ano. Segundo Mathies (2011) o melhor indicativo na determinação de um ciclo sazonal ou assazonal, em serpentes ovíparas, é a presença de ovos ou ovipostura (indicação do final do ciclo) numa determinada época do ano. No entanto, o processo de vitelogênese e de gravidez varia em tempo, tanto no indivíduo como na população, devido à existência de retenção de ovos em inúmeras espécies de serpentes (BRAZ, 2009; MATHIES, 2011). Na grande maioria das serpentes estudadas, os ovos são depositados em estações mais quentes do ano, devido ao fato do processo de embriogênese ser dependente da temperatura (PIZZATTO; MARQUES, 2006).

A aparente assincronia no desenvolvimento folicular junto com a sincronia sazonal na ovipostura indica que as taxas de vitelogênese variam entre indivíduos (MATHIES, 2011). Segundo Licht (1984) a taxa de vitelogênese não pode ser considerada constante, assim ela depende da temperatura e da condição corpórea da fêmea. Em indivíduos considerados “income breeders” (vitelogênese suportada pelo consumo recente de alimentação) a taxa de vitelogênese pode ser longa e variável (CREE et al., 1991). Já “capital breeders” (vitelogênese suportada pela mobilização de energia via tecido adiposo) tem maior potencial para suportar taxas constantes de vitelogênese (LANCE; LOFTS, 1978). Segundo Pizzatto e Marques (2006) fêmeas de *L. miliaris* cessam a sua alimentação durante a gravidez. Isso as caracteriza como “capital breeders”, as quais apresentam taxas de vitelogênese constante. No entanto, a taxa de vitelogênese observada aqui e por Pizzatto e Marques (2006) para a população de São Paulo, é considerada variável, e não se ajusta a dita hipótese.

O padrão reprodutivo da população do Sudeste é sazonal e semelhante ao descrito para a região Sul (duas posturas). Segundo Pizzatto e Marques (2006) fêmeas de *L. miliaris* mantidas em cativeiro tem a capacidade de produzir múltiplas ninhadas. Esses achados reforçam a hipótese de estocagem de gametas e produção de mais de uma ninhada por ano. Assim, tanto a população do Sul como a do Sudeste, apresentam um ciclo sazonal bianual.

Na população do Nordeste (Bahia), fêmeas com folículos vitelogênicos foram descritas em quase todas as estações, porém, uma fêmea com ovos foi observada unicamente na primavera. De acordo com os dados levantados aqui e os observados por Pizzatto e Marques (2006) o ciclo de *L. miliaris* da região Nordeste do Brasil é do tipo sazonal com reprodução estendida. O termo reprodução estendida foi utilizado primeiramente por Seigel e Ford (1987) e definido mais claramente por Mathies (2011). Por definição a reprodução estendida é um longo período de

tempo no qual as fêmeas permanecem grávidas ou exibem folículos vitelogênicos, se comparados aos colubrídeos de zona temperada. Esse termo não é aplicado para fêmeas com vitelogênese sincrônica e anual como *Bothrops neuwiedii pubescens* (HARTMANN et al., 2004). Reprodução estendida é aplicada para espécies que exibem ciclos reprodutivos com folículos vitelogênicos entre 6 a 10 meses e ovos de 4 a 7 meses (MATHIES, 2011). Todas as espécies com reprodução estendida habitam regiões tropicais e são ovíparas. Algumas dessas espécies são: *Liophis poecylogirus* (VITT, 1983), *Geophis brachycephalus* (SASA, 1993), *Simophis rhinostoma* (JORDÃO; BIZERRA, 1995), *Erythrolamprus aesculapi* (MARQUES, 1996a), *Philodryas olfersii*, *P. nattereri* e *P. aestivus* (FOWLER et al., 1998), *Oxyrhopus guibei* (discutida aqui) (PIZZATTO; MARQUES, 2002), *Liophis jaegeri* (FROTA, 2005), *Liophis semiaureus* (BONFIGLIO, 2007) e *Mastigodryas bifossatus* (MARQUES; MURIEL, 2007).

A classificação do ciclo em sazonal com reprodução estendida em *L. miliaris* do Nordeste é diferente daquela descrita por Pizzatto e Marques (2006). Os autores caracterizaram este como ciclo contínuo em virtude da distribuição de folículos vitelogênicos na maioria das estações do ano. Segundo Mathies (2011), a determinação de assazonalidade baseada na distribuição mensal de folículos vitelogênicos pode levar a erros na classificação do ciclo. Em *Tropidonophis mairii* (colubrídeo australiano) folículos vitelogênicos e ovos observados em todas as estações do ano, caracterizaram o ciclo como assazonal (SHINE, 1991; BROWN; SHINE, 2002). No entanto, 85% das fêmeas grávidas se apresentaram nos meses de julho e agosto e os outros 15% distribuídos entre outras estações. Essa sazonalidade ou pico reprodutivo nos meses de julho e agosto indicaram uma maior sincronização em fêmeas de *T. mairii*, o qual caracterizou o ciclo como sazonal (MATHIES, 2011). Esse padrão com picos reprodutivos nas épocas mais quentes e chuvosas em ciclos considerados contínuos já foi descrito por outros autores (SEIGEL; FORD, 1987; PIZZATO; MARQUES, 2002; PIZZATTO; MARQUES, 2006). O termo reprodução contínua ou ciclo contínuo não foi adotado no presente estudo, uma vez que implica que a taxa de todos os processos reprodutivos de um indivíduo permaneçam virtualmente constantes ao longo da sua vida adulta (LICHT, 1984). Isso também pode ser aplicado para as populações, já que é pouco provável que a taxa de reprodução de qualquer população seja verdadeiramente contínua durante todo ano (MATHIES, 2011). Na população do Nordeste não foi evidenciada produção de múltiplas ninhadas, o que coincide com o observado por Pizzatto e

Marques (2006). Entretanto, a hipótese de múltiplas ninhadas para essa população não foi descartada devido à capacidade da fêmea de estocar esperma.

Com relação à época de acasalamento, foram observadas diferenças entre as populações investigadas. Os animais da região Sul e Sudeste se acasalaram na estação seca (outono-inverno), enquanto que os da região Nordeste (Sul da Bahia) durante a primavera. A temperatura no Sul e Sudeste se caracterizou por um padrão fortemente sazonal, porém, o índice pluviométrico variou de assazonal (Sul) a sazonal (Sudeste). Já na população do Nordeste tanto a pluviosidade como a temperatura são elevados na maior parte do ano. Assim a mudança da época da cópula sugere estar relacionada à temperatura e não a pluviosidade. Segundo Seigel e Ford (1987), a reprodução em serpentes de áreas temperadas está limitada principalmente a temperatura, enquanto que em regiões tropicais pode ser relacionada tanto a temperatura como a pluviosidade. Os resultados obtidos para *L. miliaris* não condizem com essa hipótese em relação à pluviosidade, porém, é importante ressaltar que essa variação na cópula pode estar ligada também ao ciclo do macho (espermatogênese e segmento sexual renal). Para melhor compreensão do processo como um todo, futuros estudos do ciclo reprodutivo do macho auxiliarão no entendimento das diferentes épocas de cópula entre as populações.

5.3.2 *Oxyrhopus guibei* (falsa coral)

O ciclo reprodutivo de *O. guibei* mostrou variações entre as populações do Sul em relação ao Sudeste e Nordeste. As amostras investigadas do Sul foram restritas principalmente ao Estado de Paraná, onde a temperatura é extremamente sazonal e a pluviosidade diminui nos meses mais frios do ano (Julho e Agosto). Nessa população o ciclo reprodutivo se caracterizou por ser sazonal e sincrônico, com folículos vitelogênicos e ovos durante a primavera. Na maioria das serpentes neotropicais estudadas a vitelogênese começa na primavera, com ovipostura na primavera-verão, e eclosão dos ovos no verão-outono (FOWLER et al., 1998; MARQUES, 2002; ROJAS, 2009). Esse padrão observado para *O. guibei* do Sul prioriza a ovipostura durante estações mais quentes do ano, e consequentemente pode acelerar o desenvolvimento embrionário e reduzir a incidência de anomalias (VINEGAR, 1977). A estocagem de esperma descrita no

infundíbulo (verão, outono e inverno) para essa população, não descarta a possibilidade de múltiplas ninhadas, a partir de um único acasalamento. No entanto, a utilização dessa estratégia reprodutiva com consequente ovipostura parece não ocorrer no mesmo ano.

Segundo Dehaas (1941) existem diferenças sutis nos processos reprodutivos de machos e fêmeas que são fundamentais para compreender os ciclos reprodutivos de serpentes. A produção de gametas pela fêmea (indivíduo), ao contrário da espermatogênese no macho, não pode ser considerada acíclica. Isso, porque que os folículos recrutados para o processo de vitelogênese compõem apenas um grupo discreto de todo o ovário (CALLARD; KLEIS, 1987). Segundo Mathies (2011) grande parte das serpentes fêmeas exibe uma quiescência ou parada folicular durante o ciclo reprodutivo, o que a caracteriza como reprodução cíclica descontínua. Entretanto, em fêmeas com múltiplas ninhadas, uma série de folículos inicia a sua atividade enquanto a fêmea ainda está grávida. Esse padrão de desenvolvimento gonadal é caracterizado como contínuo (diminuição de atividade folicular).

A população de *O. guibei* do Sudeste mostrou folículos vitelogênicos durante o ano todo, no entanto, fêmeas com ovos foram visualizadas unicamente na primavera. Esse padrão foi influenciado diretamente pelo número baixo de amostras, já que Pizzatto e Marques (2002) evidenciaram ovos em quase todas as estações do ano, entretanto, esses foram mais abundantes durante a primavera. A presença de ovos durante a estação seca (outono-inverno) observada por Pizzatto e Marques (2002) é bem menor se comparada à estação chuvosa. Esse padrão pode estar relacionado à assincronicidade dos indivíduos em relação à população. DeHaas (1941) estudando fêmeas de *Elapoidis fusca* observou que estas apresentam ovos em todos os meses do ano, no entanto, a porcentagem entre as estações variou sazonalmente. Assim do ponto de vista populacional o ciclo foi caracterizado como sazonal (DEHAAS, 1941).

As estruturas de estocagem de esperma descritas em *O. guibei* permite a produção de múltiplas ninhadas a partir de uma cópula. Pizzatto e Marques (2002) estudando o ciclo reprodutivo de *O. guibei* em cativeiro isolado, observaram diversas posturas de ovos em anos diferentes (outubro de 1999, 2000 e 2001). Isso denota que a espécie tem a habilidade de estocar gametas no mínimo por três anos. Essa capacidade de guardar esperma por longos períodos torna a fêmea o componente principal do ciclo reprodutivo, já que é ela que determina o momento certo para produzir ninhadas. Apesar de apresentar folículos vitelogênicos em grande parte do ano, *O.*

guibei do Sudeste tem um ciclo reprodutivo sazonal com reprodução estendida e múltiplas posturas.

Os resultados com relação ao ciclo reprodutivo de *O. guibei* do Nordeste mostraram um ciclo semelhante ao descrito para a região Sudeste, definido como sazonal estendido. Foi observada uma única fêmea com ovos no inverno, o qual é reflexo da amostra pequena utilizada. No entanto, a escassez de fêmeas com ovos, em coleções científicas, também pode estar diretamente ligada ao curto tempo que os ovos ficam na fêmea, se comparada ao tempo da vitelogênese (MATHIES, 2011). Nas duas populações (Sudeste e Nordeste), a época de acasalamento ocorreu no inverno e verão. A estação de acasalamento parece sofrer pouca influência do clima (pluviosidade e temperatura) na fêmea, já que o ciclo é semelhante em locais com padrão climático diferente.

5.3.3 *Philodryas patagoniensis* (parelheira)

Em *P. patagoniensis* os ciclos reprodutivos das fêmeas provenientes do Sul e Sudeste apresentaram um padrão diferente. Na população do Sul, folículos vitelogênicos foram descritos em todas as estações, no entanto, a presença de ovos se limitou ao inverno-primavera. A distribuição assazonal de folículos vitelogênicos associado a fêmeas ovígeras numa determinada época do ano caracterizam o ciclo reprodutivo como sazonal estendido. Já na população do Sudeste os folículos vitelogênicos e ovos se concentraram principalmente no inverno-primavera. Fowler et al. (1998) estudando quatro espécies de *Philodryas* de ampla distribuição no Brasil (*P. olfersii*, *P. nattereri*, *P. patagoniensis* e *P. aestivus*) observaram algumas diferenças entre os ciclos reprodutivos destas. Em *P. patagoniensis* do Sudeste a vitelogênese é mais curta (agosto a dezembro), se comparada às outras espécies de *Philodryas*. A ovulação foi restrita a primavera com ovipostura e eclosão dos ovos no verão (FOWLER et al., 1998). Os dados apresentados aqui são semelhantes ao descrito por Fowler et al. (1998) o que caracteriza o ciclo como sazonal sincrônico. Essa diferença na distribuição dos folículos vitelogênicos entre as populações de *P. patagonensis* pode estar associada à alimentação e pluviosidade. Geralmente, variações nas características reprodutivas entre populações da mesma espécie são frequentemente atribuídas a

condições climáticas e disponibilidade de alimento (SOLORZANO; CERDAS, 1989; PIZZATTO; MARQUES, 2006; MATHIES et al., 2010). Hartmann e Marques (2005) observaram que durante outono-inverno, fêmeas de *P. patagoniensis* da região Sul do Brasil se alimentam principalmente de anuros (Leptodactylidae), e em menor grau, de mamíferos e lagartos. O índice pluviométrico constante no outono-inverno nessa região pode estar diretamente relacionado ao maior consumo de anuros durante essas estações, e consequentemente a um desenvolvimento folicular maior.

A estação de acasalamento no outono e a estocagem descrita na região Sul sugerem que uma parcela de gametas unicamente seja utilizada para fertilização na mesma estação. Já a porção restante pode ficar estocada na JUV ou nos RE no infundíbulo. Entretanto, como essa divisão espermiática ocorre dentro da fêmea, ainda é desconhecida. Segundo Karr e Pitnik (1999), o trato reprodutor feminino é complexo e possui trajetos tortuosos, túbulos de estocagem de esperma escondidos e localizados em extremidades, assim como diferentes tipos de epitélio. Essas características podem levar a uma competição espermiática dentro da fêmea, o que é comum em sistemas poligâmicos. A viabilidade e utilização do esperma estocado nas diferentes regiões do oviduto de *P. patagoniensis* (receptáculos infundibulares e sulcos da JUV) precisam ser avaliadas futuramente. Estudos em campo associados à inseminação artificial de fêmeas mantidas em cativeiro poderão determinar o tempo exato que o esperma fica armazenado na fêmea. Em resumo, a população de *P. patagoniensis* do Sul apresenta uma assincronicidade folicular maior se comparada ao do Sudeste. Assim, diferenças na distribuição de folículos vitelogênicos durante o ciclo reprodutivo sugerem estar relacionadas à disponibilidade de presas nessas populações.

5.3.4 *Tomodon dorsatus* (cobra espada)

O ciclo reprodutivo de *T. dorsatus* da região Sudeste do Brasil, já foi descrito anteriormente por meio de medidas macroscópicas por BIZERRA et al. (2005). Assim, de acordo com estes autores, *T. dorsatus* apresenta um ciclo reprodutivo sazonal e bienal, com vitelogênese secundária no início da estação chuvosa (primavera) e presença de embriões no oviduto durante primavera, verão e outono (BIZERRA et al., 2005). Essa gestação longa ocorre em consequência

da baixa taxa metabólica e ingestão de alimento (BIZERRA et al., 2005). A parturição ocorre durante a estação seca (inverno) e a época de cópula na primavera (BIZERRA et al., 2005).

No presente estudo foi observado que *T. dorsatus*, tanto do Sul como do Sudeste apresenta o mesmo padrão reprodutivo que descrito por Bizerra et al. (2005). A época de acasalamento foi confirmada pelas análises histológicas que ratificaram que ocorre durante a primavera. Apesar da temperatura mostrar um padrão bem sazonal para essas duas regiões, o índice de pluviosidade é maior na região Sul. Assim, a ausência de variabilidade nos traços reprodutivos entre essas populações de *T. dorsatus* (diferentes condições climáticas) podem ser atribuídas à inércia filogenética (JAMES; SHINE, 1985; VITT, 1992; ORZAK; SOBER, 2001). Esse padrão de inércia já foi descrito em viperídeos neotropicais do gênero *Bothrops* e *Crotalus*, o qual é caracterizado pela retenção de padrões reprodutivos ancestrais como época de acasalamento, vitelogênese, parturição e estocagem de esperma por longo período de tempo (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997, 2002; BARROS et al., 2012).

5.4 CICLO OVIDUTAL

5.4.1 *Liophis miliaris* (cobra da água)

As variações ovidutais descritas para *L. miliaris* nos diferentes estágios reprodutivos foram similares entre as populações. O epitélio secretor do infundíbulo apresentou uma maior atividade durante a fase ativa ovariana (folículos vitelogênicos). Esse aumento na secreção parece estar ligado ao processo de ovulação e foi relatado para outras serpentes (PALMER; GUILLETTE, 1991; PERKINS; PALMER, 1996; ROJAS, 2009). As análises ultraestruturais e histoquímicas do infundíbulo também apresentam um padrão de maior atividade celular em fêmeas vitelogênicas. Isso sugere que fêmeas dessa espécie se encontram sobre um controle hormonal ovariano, como descrito para *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (ALMEIDA-SANTOS, 2005). O epitélio infundibular é constituído por células ciliadas e secretoras, das quais as segundas não mostram variação sazonal e são estruturalmente idênticas às encontradas em

todo o epitélio ovidutal. A função das células ciliadas é manter a movimentação de muco e debris celulares dentro do oviduto, além de auxiliar a circulação do esperma (GIRLING, 2002). Já as células secretoras produzem vacúolos eletrodensos durante a fase ativa ou vitelogênese secundária e possuem núcleos eucromáticos basais. Esse padrão é semelhante ao descrito para *Agkistrodon piscivorus* (SIEGEL; SEVER, 2008b) e *Seminatrix pygaea* (SEVER et al., 2000), porém difere do observado para *Diadophis punctatus* (PERKINS; PALMER, 1996). Em fêmeas vitelogênicas de *L. miliaris* as organelas descritas com maior frequência são o RER, REL e mitocôndrias. A maior concentração dessas organelas no citoplasma sugere um aumento na produção de glicoproteínas e lipídeos durante a fase ativa. No infundíbulo de *A. piscivorus* e *S. pygaea* as organelas encontradas em maior número nas células secretoras são as mitocôndrias e o REL, no entanto, *S. pygaea* também apresenta RER (SEVER et al., 2000; SIEGEL; SEVER, 2008b; SIEGEL et al., 2011).

O oviduto de *L. miliaris* tem a capacidade de produzir carboidratos neutros e glicosaminoglicanos carboxilados (mucopolissacarídeos ácidos) em todas suas regiões, como também observado para outros Squamata (FOX, 1956; SAINT-GIRONS, 1975; BAUMAN, METTER, 1977; PERKINS; PALMER, 1996; SEVER et al., 2000). A reação positiva para AB tem como principal função a retenção de água e manutenção da umidade constante na mucosa uterina (PERKINS; PALMER, 1996; HEULIN et al., 2005). Já a positividade para PAS parece estar ligada a processo de estocagem de esperma em serpentes. Em *L. miliaris* foi observado que a positividade para PAS aumenta nos RE preenchidos de gametas, entretanto, isso não acontece em relação a AB. O aumento na produção de carboidratos neutros sugere um processo de nutrição e determina uma atividade química (refúgio químico). Em serpentes como *Thamnophis sirtalis* (HOFFMAN; WIMSATT, 1972) *Tantilla coronata* (ALDRIDGE, 1992), *Diadophis punctatus* (PERKINS; PALMER, 1996), *Seminatrix pygaea* (SEVER; RYAN, 1999) e *Agkistrodon piscivorus* (SIEGEL; SEVER, 2008a) os RE reagem positivamente para PAS na presença de gametas.

Em *L. miliaris*, o aumento do epitélio das glândulas infundibulares em fêmeas vitelogênicas (Sul e Sudeste) pode estar associado à época de acasalamento, já que essas glândulas são altamente ciliadas e seriam as responsáveis por atrair os espermatozóides da vagina até o infundíbulo (FOX, 1956). A ultraestrutura dessas glândulas mostrou que além de células ciliadas também são observadas células secretoras, característica não relatada por Fox (1956) pela

ML. Assim, a aglomeração de mitocôndrias na porção apical da célula ciliada associada às células secretoras, indica uma elevada produção de ATP para movimentação dos cílios e atração e manutenção dos espermatozoides. Entretanto, o tempo de estocagem nessas glândulas é curto se comparado aos RE, devido a que só foi achado esperma num curto período de tempo após cópula. Diferentemente do observado para a população do Sul e Sudeste, *L. miliaris* do Nordeste mostrou um aumento das glândulas infundibulares em fêmeas pré-vitelogênicas e vitelogênicas. Esse padrão distinto pode ser reflexo de um ciclo reprodutivo estendido, com maiores oscilações hormonais.

Segundo Hoffman (1970) o epitélio uterino de *T. sirtalis* produz mucopolissacarídeos ácidos utilizados na formação da membrana da casca. Nas três populações de *L. miliaris*, a diminuição do epitélio uterino durante a gravidez torna difícil a produção de material secretor com essa finalidade. Já o aumento das glândulas uterinas em fêmeas vitelogênicas (três populações) teria função de produzir proteínas para formação da membrana da casca. Esse modelo já foi descrito para *Diadophis punctatus* (PERKINS; PALMER, 1996) e *Lacerta vivípara* (HEULIN et al., 2005). Segundo Hoffman (1970), as glândulas uterinas de *T. sirtalis* são responsáveis pela produção de pseudoqueratina, principal componente da membrana da casca nessa espécie.

Em fêmeas vitelogênicas, as células das glândulas uterinas produzem vacúolos levemente eletrodensos em maior proporção, se comparadas a fêmeas pré-vitelogênicas e grávidas. A presença de RER em abundância nessas células indica que o material produzido nessas glândulas é constituído principalmente por proteína. Já a negatividade descrita para Abr sugere que o corante não tem afinidade pelo tipo de proteína encontrada na membrana da casca. Durante o ciclo reprodutivo de *L. miliaris* também foi possível identificar uma maior vascularização uterina em fêmeas vitelogênicas e grávidas. Esse aumento também foi relatado em alguns lagartos ovíparos (BHATIA; DAYAL, 1933; MASSON; GILLETTE, 1987). Segundo alguns autores, durante o desenvolvimento embrionário, o epitélio do útero diminui e a lâmina própria torna-se altamente vascularizada principalmente em espécies vivíparas (BLACKBURN, 1998; SIEGEL et al., 2011). Em *L. miliaris*, a diminuição do epitélio uterino em fêmeas grávidas ocorreu em consequência do alargamento ou estiramento da parede do útero, seja pelo aumento das glândulas uterinas ou pelo ovo mantido no lúmen. Essa mudança epitelial foi descrita em

alguns lagartos e serpentes da América do Norte e Europa, porém, em nenhuma espécie ovípara neotropical até hoje (PERKINS; PALMER, 1996; HEULIN et al., 2005).

A atividade secretora epitelial da JUV em *L. miliaris* evidenciou também um aumento ligado ao estágio reprodutivo vitelogênico. Isso significa que esse aumento é influenciado em parte por variações hormonais durante o ciclo reprodutivo. Segundo Almeida-Santos et al. (2004), fêmeas de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) apresentam elevados níveis de estradiol durante a vitelogênese secundária. O epitélio dessa região já foi descrito pela ultraestrutura em *S. pygaea* (SEVER et al., 2000), *C. durissus* e *B. jararaca* (ALMEIDA-SANTOS, 2005), e também em *A. piscivorus* (SIEGEL; SEVER, 2008b). O epitélio de *L. miliaris* é semelhante ao descrito para as espécies citadas acima, constituído por células com cílios alongados que se alternam com células secretoras. A morfologia das células ciliadas é caracterizada por numerosas mitocôndrias associadas a corpúsculos basais onde são ancorados os cílios. Esse modelo é idêntico ao descrito por outros autores (SEVER et al., 2000; ALMEIDA-SANTOS, 2005; SIEGEL; SEVER, 2008b). As células secretoras liberam material floculento pelo processo merócrino (liberação por exocitose sem perda de material citoplasmático) e macro vacúolos pelo apócrino (perda de material citoplasmático). O primeiro modo de secreção já foi relatado em *S. pygaea* (SEVER et al., 2000), já a descrição de macrovacúolos pela JUV não foi observada para nenhuma espécie estudada. A eletrodensidade desse material sugere uma composição lipídica, no entanto, a sua verdadeira função não foi possível de ser determinada. Sugere-se que essa secreção possa nutrir o esperma ou sirva como uma matriz carregadora durante sua ascensão até o infundíbulo. Contudo, a ausência de esperma nessa espécie deixa essa questão aberta.

A vagina de *L. miliaris* apresentou um epitélio predominantemente secretor com esporádicas células ciliadas apicalmente. Esse padrão é igual ao descrito para *Bungarus fasciatus*, *Cerastes cerastes*, *Coniophanes fissidens*, *Coronella austriaca* e *Vipera aspis* (GABE; SAINT-GIRONS, 1965). Outra característica da vagina de *L. miliaris* é a capacidade de produzir carboidratos neutros e glicosaminoglicanos carboxilados durante grande parte do ciclo reprodutivo. No entanto, fêmeas vitelogênicas aumentam a produção durante esse estágio reprodutivo, o que sugere influência hormonal. Essas células secretoras da vagina liberam material por secreção merócrina igual à vagina de *A. piscivorus* (SIEGEL; SEVER, 2008b). A presença de RER e AG no citoplasma da célula durante grande parte do ano sugere atividade de síntese constante (glicoproteínas). Esse material que é sintetizado e secretado por modo

merócrino pode servir de matriz carregadora para o esperma, após o acasalamento no outono (HALPERT et al., 1982).

5.4.2 *O. guibei* (falsa coral)

Em *O. guibei* o infundíbulo mostrou variações morfológicas e ultraestruturais que coincidem parcialmente entre as populações. O infundíbulo (epitélio e glândulas) de *O. guibei* do Sul e Sudeste se mostrou mais ativo em fêmeas pré vitelogênicas em comparação as vitelogênicas (Nordeste). Isso sugere que outros hormônios além do estradiol descrito para *Crotalus durissus terrificus* (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004) poderiam manter o epitélio ativo em fêmeas quiescentes. Análises ultraestruturais das células infundibulares de espécimes do Sudeste indicaram um núcleo constituído por cromatina descondensada (eucromatina) de aspecto granular e claro. Segundo Junqueira e Carneiro (2008), o núcleo eucromático possui filamentos de DNA descondensados e consequentemente tem condições de transcrever genes. Portanto, eucromatina significa cromatina ativa, e é mais abundante em células que produzem muita proteína.

As análises histoquímicas em *O. guibei* revelaram produção de carboidratos neutros e glicosaminoglicanos carboxilados unicamente. O Azul de Bromofenol (Abr) mostrou uma reação negativa para o epitélio, no entanto, talvez o tipo de proteína produzida pelo epitélio não possa ser revelada por esse corante. As células secretoras do infundíbulo produziram vacúolos que variaram de eletrobrancos a eletrobrancos durante verão, outono e inverno, e diminuíram na primavera. Essa menor atividade coincidiu com a diminuição da altura epitelial observada em fêmeas grávidas.

Glândulas tubulares ciliadas no infundíbulo de *O. guibei* apresentaram a mesma conformação estrutural que relatada em *L. miliaris*. No entanto, a descrição de uma suposta espermiófagia para essas glândulas é inédita para uma serpente neotropical. Alguns autores descreveram esperma embebido no epitélio infundibular (intra e intercelularmente) de serpentes como *T. sirtalis* (HOFFMAN; WIMSAT, 1972) e *A. piscivorus* (SIEGEL; SEVER, 2008b), porém não foram observados lisossomos (organelas envolvidas na digestão enzimática). Sever e Brizzi (1998) observaram que o esperma que penetra no epitélio ovidutal em salamandras

difícilmente se libera e assim não consegue fertilizar o óvulo. O padrão observado em *O. guibei* é o mesmo descrito para o lagarto *Scincella laterale* (SEVER; HOPKINS, 2004), o qual é caracterizado por fagossomos e lisossomos no citoplasma da célula. Os lisossomos são depósitos de enzimas utilizadas pelas células para digerir moléculas introduzidas por pinocitose, fagocitose, ou organelas da própria célula (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Assim, a presença de lisossomos no citoplasma das glândulas tubulares sugere uma iminente fagocitose.

Durante o ciclo reprodutivo, fêmeas vitelogênicas de *O. guibei* apresentaram aumento significativo no diâmetro dos capilares uterinos e das glândulas uterinas. Da mesma maneira que em *L. miliaris*, as glândulas uterinas aumentaram antes da ovulação e regrediram muito após esta. Essa regressão ocorreu em função da liberação de grânulos secretores utilizados para a formação de fibras protéicas da membrana da casca (PERKINS; PALMER, 1996). No entanto, em *O. guibei* os capilares uterinos aumentaram principalmente durante a gravidez, diferente de *L. miliaris* no qual esse aumento ocorreu durante a vitelogênese e gravidez. Ultraestruturalmente, o útero de *O. guibei* é semelhante em forma e função ao de *L. miliaris*, constituído principalmente por células secretoras com abundantes mitocôndrias na porção apical e vacúolos levemente eletrodensos. Também foram observadas células ciliadas esparsas pelo epitélio em menor número. Em serpentes, o útero constitui a maior porção contida no oviduto de uma serpente (SIEGEL et al., 2011). Contudo, poucos estudos investigaram a microanatomia ovidutal em diferentes condições reprodutivas (GIACOMINI, 1893; GIERBERG, 1922; SAINT-GIRONS, 1957; HOFFMAN, 1970; MEAD et al., 1981; PERKINS; PALMER, 1996; BLACKBURN, 1998; SIEGEL et al., 2011). Em *O. guibei* do Sul e Sudeste, a altura do epitélio uterino aumentou durante a gravidez e diferiu do padrão descrito para a população do Nordeste. A explicação para esse processo poderia estar ligada a diferentes momentos reprodutivos durante a coleta dos espécimes. Nos animais que foram coletados logo após a ovulação seria esperado que o epitélio permanecesse alto, em comparação com animais de gravidez avançada. No entanto, os diferentes níveis de diversidade encontrados no útero de serpentes não descartam um suposto processo de retenção de ovos com deposição lenta da casca do ovo (BRAZ, 2009; SIEGEL, et al., 2011).

Em *O. guibei* do Sudeste, as células secretoras da JUV apresentaram pouca atividade de síntese em fêmeas pré-vitelogênicas, o que indica que a atividade desse epitélio permanece sobre controle hormonal. Durante a fase de quiescência, no entanto, as células secretoras foram capazes

de armazenar material eletrolucente durante o outono. A época de acasalamento para a população do Sudeste foi descrita no inverno e verão. Entretanto, espermatozoides observados no lúmen da JUV de uma fêmea pré-vitelogênica na primavera sugere uma estocagem por curto tempo ou espermatozoides remanescentes de um acasalamento anterior.

A vagina de *O. guibei* se caracterizou por células altas com produção constante de vacúolos levemente eletrodensos e eletrolucidos. A liberação desse material ocorre por secreção merócrina, como descrito para *A. piscivorus* (SIEGEL; SEVER, 2008b). No entanto, *O. guibei* também exibiu secreção holócrina, a qual se caracteriza pela liberação de todo o material citoplasmático. Na maioria das espécies de serpentes estudadas até hoje, essa porção uterina tem a capacidade de manter níveis homogêneos de atividade secretora durante o ciclo reprodutivo (SEVER et al., 2000; SIEGEL; SEVER, 2008b).

Em *O. guibei* também foram descritas duas estruturas que são peculiares desta porção ovidutal: os desmossomos e as células mastócitos. Os primeiros são encontrados entre as células epiteliais e são definidos como junções intercelulares de adesão. A função dessa junção é manter aderida uma célula à outra por meio de glicoproteínas transmembrânicas conhecidas como caderinas (ALBERTS et al., 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Essas glicoproteínas são dependentes de íons cálcio, assim na ausência deste, a célula perde a capacidade de adesão. Já as células mastócitos são encontradas em maior concentração no tecido conjuntivo e possuem grânulos citoplasmáticos ricos em heparina e histamina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Estas células são envolvidas principalmente em reações alérgicas, no entanto, se sugere que na vagina de serpentes atuem na defesa contra organismos patogênicos (SIEGEL et al., 2011).

As variações nas medidas microscópicas para as três populações indicaram que o ciclo de *O. guibei* apresenta muitas oscilações entre fêmeas ativas e inativas durante o ciclo reprodutivo. Assim, a falta de conhecimento em relação aos hormônios envolvidos nos ciclos reprodutivos de serpentes neotropicais torna difícil a compreensão dessa gama de variações morfológicas que ocorrem durante o ciclo reprodutivo. O estudo de hormônios específicos que participam dessas variações talvez determine um padrão para essa espécie.

5.4.3 *Philodryas patagoniensis* (parelheira)

As variações microanatômicas durante o ciclo reprodutivo da fêmea de *P. patagoniensis* do Sul e Sudeste revelaram algumas diferenças sazonais. Na população do Sudeste, onde o desenvolvimento folicular é mais sazonal, as variações ovidutais acompanharam esse padrão. As análises histoquímicas pelo PAS e AB confirmaram esse aumento de secreção durante inverno-primavera, onde foram observadas principalmente fêmeas vitelogênicas. Análises ultraestruturais do epitélio infundibular coincidem com os achados pela ML, com produção de vacúolos eletrodensos no inverno-primavera e eletrolucentes no outono. O núcleo eucromático associado a organelas ativas como RER, AG e mitocôndrias indica síntese de material. O material produzido no citoplasma é liberado pelo modo apócrino igual que em *L. miliaris*. Esse padrão sazonal de secreção sugere que níveis hormonais elevados estimulem as diferentes regiões do oviduto, de uma forma sincrônica durante o ciclo reprodutivo.

Nas fêmeas do Sul que apresentaram um ciclo sazonal estendido os níveis hormonais sugerem maiores oscilações. Isso pode ser determinado pelo aumento desordenado ou assincronicidade das diferentes porções do oviduto. Nessas fêmeas, o epitélio uterino aumenta consideravelmente durante a gravidez, porém, o contrário ocorreu nas fêmeas do Sudeste. Nestas últimas, a menor altura do epitélio uterino é observado nas fêmeas ovígeras. Os estudos ultraestruturais também ressaltaram essas variações nas células do útero de *P. patagoniensis*. Durante o inverno e a primavera, tanto o epitélio como as glândulas uterinas aumentaram a síntese de material citoplasmático. Assim, as variações descritas pela morfometria microscópica coincidem com as mudanças ultraestruturais. As glândulas uterinas de *P. patagoniensis* também possuem células com abundante RER no seu citoplasma como descrito para outras serpentes (HOFFMAN, 1970; SIEGEL; SEVER, 2008b).

Na JUV de *P. patagoniensis* (Sudeste) o epitélio secretor aumentou em fêmeas vitelogênicas e grávidas. Esse aumento da secreção epitelial (principalmente grânulos ricos em carboidratos neutros) pode ser em razão de uma estocagem de esperma, já que *P. patagoniensis* tem essa capacidade funcional. Em várias espécies de serpentes essa atividade secretora pelas células da JUV já foi relatada (FOX, 1956; SAINT-GIRONS, 1975; BAUMAN; METTER, 1977; PERKINS; PALMER, 1996; SEVER et al., 2000).

Analisando a ultraestrutura do epitélio ciliado da JUV se observou que essas células são dotadas de esterocílios na borda luminal. Esses prolongamentos imóveis têm por função aumentar a área de superfície e facilitar o movimento de moléculas para dentro e fora da célula (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Outra característica da JUV de *P. patagoniensis* foram invaginações do próprio epitélio luminal formando glândulas tubulares. A funcionalidade dessas glândulas ainda é incerta, no entanto, sua morfologia lembra as glândulas tubulares do infundíbulo posterior. A capacidade de *P. patagoniensis* de estocar esperma na JUV por meio de sulcos sugere que essas invaginações também funcionem como local de estocagem, embora, não foi achado esperma.

A vagina de *P. patagoniensis* apresentou as mesmas características ultraestruturais que relatadas em *O. guibei*. A atividade epitelial da vagina (três populações) se apresentou elevada em fêmeas pré-vitelogênicas e vitelogênicas, em relação às grávidas. Esse aumento sugere que após ovipostura o epitélio vaginal seja parcialmente ou totalmente liberado (secreção apócrina ou holócrina) junto ao ovo. Fêmeas de *P. patagoniensis* apresentaram secreção holócrina durante o verão, o que indica uma eliminação de todo o conteúdo epitelial. Após a liberação desse material um novo epitélio deve ser produzido no próximo ciclo o que caracteriza uma renovação tecidual. Assim, esse aumento do epitélio nas fêmeas pré-vitelogênicas e vitelogênicas pode ocorrer em consequência de um processo de reestruturação epitelial.

5.4.4 *Tomodon dorsatus* (cobra espada)

Ambas as populações de *T. dorsatus* exibiram variações estruturais semelhantes entre os diferentes estágios reprodutivos. Em fêmeas vitelogênicas, o aumento das glândulas tubulares e das células secretoras e ciliadas do infundíbulo sugere uma elevada influência hormonal. A secreção produzida por essas células é rica em carboidratos neutros e glicosaminoglicos carboxilados (ácidos). Esse padrão de secreção observado em *T. dorsatus* também foi descrito para *S. pygaea* (SEVER; RYAN, 1999). As análises ultraestruturais das células secretoras do infundíbulo acompanharam um padrão sazonal de secreção. Durante outono-inverno onde foram observadas algumas fêmeas pré-vitelogênicas (com exceção das gestantes), o núcleo

heterocromático da célula indicou baixa atividade de síntese nuclear. Também, foram descritos vacúolos eletrolucos no citoplasma dessas células. Já na época ativa, o núcleo se apresentou eucromático e os vacúolos eletrodensos. O AG, RER e as mitocôndrias foram as organelas mais proeminentes durante a fase ativa, semelhante ao descrito para *T. sirtalis* (HOFFMAN; WIMSATT, 1972) e *A. piscivorus* (SIEGEL; SEVER, 2008a). Essa variação na eletrodensidade dos vacúolos durante o ciclo reprodutivo de *T. dorsatus* parece estar sobre controle da atividade ovariana.

O epitélio e as glândulas uterinas de *T. dorsatus* também aumentaram drasticamente em fêmeas vitelogênicas, padrão observado para alguns Squamata vivíparos como *Vipera aspis* (SAINT-GIRONS, 1975) e *Hoplodactylus maculatus* (GIRLING et al., 1997). Os vacúolos citoplasmáticos produzidos pelas células secretoras uterinas repetem o padrão apresentado pelo infundíbulo. No qual se observa uma maior eletrodensidade de vacúolos em fêmeas vitelogênicas durante inverno-primavera. A determinação específica do tipo de material secretado presente nos vacúolos eletrolucos e eletrodensos foi parcialmente identificada neste estudo. No entanto, precisa-se de técnicas mais apuradas que identifiquem com melhor precisão o tipo de molécula produzida por essas células.

Nas glândulas uterinas de *T. dorsatus* as organelas mais proeminentes são as mitocôndrias e diferem das espécies ovíparas que apresentam em sua maioria RER. Essa diferença na densidade de organelas está diretamente associada ao modo reprodutivo vivíparo. Já que nas ovíparas, quanto maior o número de RER no citoplasma, maior a produção de proteínas necessárias para produção da membrana da casca no ovo.

Durante a gestação a maioria das espécies vivíparas de serpentes apresentou uma diminuição do epitélio (ciliado e secretor) e um aumento acentuado da vascularização na lâmina própria (HOFFMAN, 1970; BLACKBURN, 1998; SIEGEL et al., 2011). Em *T. dorsatus* esse padrão se repete e os capilares sanguíneos apresentam um diâmetro bem maior que o observado nas espécies ovíparas investigadas. Esse aumento também foi descrito em alguns lagartos (GIACOMINI, 1891; GIERBERG, 1922; BLACKBURN, 1998). O processo de aumento na vascularização indica uma elevada troca de gases e nutrientes entre mãe e feto. Em *T. dorsatus*, essa troca ocorre por meio de uma placenta corioalantóica, que tem como principais funções a troca de gases e o transporte de cálcio (STEWART; THOMPSON, 2000). Além, dessas funções também é sugerido que a placenta corioalantóica seja responsável pela produção de progesterona

na manutenção da gestação (ALMEIDA-SANTOS, 2005). A membrana da casca observada na placenta de *T. dorsatus* é fina, e provavelmente não interfere nas trocas fisiológicas materno-fetais, como descritas também para *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (ALMEIDA-SANTOS, 2005).

A conformação epitelial da JUV é igual à descrita para as espécies ovíparas, com células ciliadas munidas de estereocílios e células secretoras de microvilos. Isso significa que ambas as células tem a capacidade de transportar moléculas para fora e para dentro da célula. Em *T. dorsatus*, o aumento da atividade epitelial da JUV em fêmeas gestantes sugere um ambiente propício para estocagem de gametas como observado em *T. dorsatus* do Sul. Já essa maior atividade de células ciliadas em fêmeas gestantes sugere a função de auxiliar o processo de parturição e eliminação de material proveniente da parturição. A vagina de *T. dorsatus* também é morfológicamente e funcionalmente semelhante as descritas para *O. guibei*, *L. miliaris* e *P. patagoniensis*.

O presente estudo mostrou que o oviduto das quatro espécies investigadas apresenta morfologia semelhante e que mudanças sofridas estão sobre influência direta da atividade ovariana. Essa variação ovariana parece depender tanto de fatores intrínsecos (inércia filogenética) como de extrínsecos (clima, alimentação) durante o ciclo reprodutivo. Assim, para compreender melhor as estratégias reprodutivas em Squamata é imprescindível interligar esses fatores com objetivo de chegar a uma conclusão precisa.

6 CONCLUSÃO

O oviduto das quatro espécies investigadas apresenta morfologia macro e microscópica semelhante com variações sazonais durante o ciclo reprodutivo. As mudanças morfológicas descritas estão sobre influência direta de atividade ovariana. Essa atividade ovariana parece depender de fatores intrínsecos, como inércia filogenética, assim como de fatores extrínsecos tais como clima, pluviosidade e disponibilidade de presas. Receptáculos de esperma estão presentes na região infundibular de três espécies estudadas: *Liophis miliaris*, *Oxyrhopus guibei* e *Philodryas patagoniensis* e provavelmente também em *Tomodon dorsatus*. Estocagem de esperma também foi encontrada na junção útero-vaginal em *Philodryas patagoniensis* e *Tomodon dorsatus* e pode indicar uma condição plesiomórfica de armazenamento.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 5. ed. New York: Garland Science, 2008.

ALBOLEA, A. B. P. **Padrões de atividade em serpentes não peçonhentas de interesse médico: *Helicops modestus* (Colubridae: Xenodontinae) e *Liophis miliaris* (Colubridae: Xenodontinae) e sua relação com a epidemiologia**. 1998. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade de Guarulhos, São Paulo, 1998.

ALDRIDGE, R. D. Oviductal anatomy and seasonal sperm storage in the southeastern crowned snake (*Tantilla coronata*). **Copeia**, v. 4, p. 1103-1106, 1992.

ALDRIDGE, R. D. The link between mating season and male reproductive anatomy in the rattlesnakes *Crotalus viridis oreganus* and *Crotalus viridis helleri*. **Journal of Herpetology**, v. 36, p. 295-300, 2002.

ALDRIDGE, R. D.; DUVALL, D. Evolution of the mating season in the pitvipers of North America. **Herpetological Monographs**, v. 16, p. 1-25, 2002.

ALDRIDGE, R. D.; SEMLITSH, R. D. Female reproductive biology of the southeastern crowned snake (*Tantilla coronata*). **Amphibia-Reptilia**, v. 13, p. 209-218, 1992.

ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. 2005. 206 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ABDALLA, F. M.; 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 Comparative Endocrinology**, v. 139, p. 169-174, 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: Crotalidae). **Japanese Journal of Herpetology**, v. 17, n. 2, p. 46-52, 1997.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. **Biology of the vipers**. Carmel: Eagle Mountain, 2002. p. 445-462.

BAKST, M. R.; BAHR, J. M. Poultry. In: HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in farm animals**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993. p. 385-402.

BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. New York: Churchill Livingstone, 1996.

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

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

BHATIA, M. L.; DAYAL, J. On the arterial system of the lizard *Hemidactylus flaviviridis* Rüpel (the wall lizard). **Anatomischer Anzeiger**, v. 76, p. 417-437, 1933.

BIRKHEAD, T. R.; MOLLER, 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.

BIZERRA A.; MARQUES O. A. V.; SAZIMA I. Reproduction and feeding of the Colubrid snake *Tomodon dorsatus* from south-eastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 26, p. 33-38, 2005.

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.

BONFIGLIO, F. **Biologia reprodutiva e dieta em *Liophis semiaureus* (Serpentes-Colubridae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2007. 47 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2007.

BOOTH, W.; SCHUETT, G. W. Molecular genetic evidence for alternative reproductive strategies in North American pitvipers (Serpentes: Viperidae): long-term sperm storage and facultative parthenogenesis. **Biological Journal of Linnean Society**, v. 104, n. 104, p. 934-942, 2011.

BOTTE, V. Some aspects of oviduct biochemistry in the lizard, *Lacerta sicula* in relation to the annual cycle. **Bolletino di Zoologia**, v. 40, p. 315-321, 1973b.

BOZZOLA, J. J.; RUSSEL, L. D. **Electron microscopy**. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 1999. p. 670.

BRAZ, H. B. P. **Retenção uterina e incubação de ovos em serpentes: implicações ecológicas e evolutivas**. 2009. 116 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

CADLE, J. E.; GREENE, H. W. Phylogenetic patterns, biogeography, and the ecological structure of Neotropical snake assemblages. In: RICKLEFS, R. E.; SCHLUTER, D. **Species diversity in ecological communities: historical and geographical perspectives**. Chicago: University Chicago Press, 1993. p. 281-293.

CALLARD, I. P.; KLEIS, S. M. Reproduction in reptiles. In: CHESTER-JONES, I.; INGLETON, P. M.; PHILLIPS, J. G. **Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology**. New York: Plenum, 1987. p. 187-205.

CLARK, D. R. Loss of the oviduct in the colubrid snake genus *Tantilla*. **Herpetologica**, v. 26, p. 130-133, 1970.

COE, W. K.; KUNKEL, B. W. The reproductive organs of the limbless lizards *Anniella*. **The American Naturalist**, v. 38, p. 451-452, 1904.

COPE, E. D. The crocodilians, lizards and snakes in North America. **Report of the U.S. National Museum**, v. 18, 155-1270, 1898.

CORSO, G.; PALA, M.; PINNA, A. M.; CARCUPINO, M. Aspetti morfo-funzionali dell'oviducto di *Chalcides ocellatus tiligugu* Gmelin (Squamata, Scincidae). **Archivio Italiano di Anatomia e di Embriologia**, v. 93, p. 237-251, 1988.

CREE, A.; GUILLETTE, L.; BROWN, M. A.; CHAMBERS, G. K.; COCKREM, J. F.; NEWTON, J. D. Slow-estradiol-induced vitellogenesis in the tuatara, *Sphenodon punctatus*. **Physiological Zoology**, v. 64, p. 1234-1251, 1991.

CREWS, D. Gamete production, sex steroid secretion, and mating behavior uncoupled. **Hormones and Behavior**, v. 18, p. 22-28, 1984

CUELLAR, O. Oviductal anatomy and sperm storage structures in lizards. **Journal of Morphology**, v. 119, p. 7-20, 1966.

DEHAAS, C. P. J. Some notes on the biology of snakes and their distribution in two districts of west Java. **Treubia**, v. 18, p. 327-375, 1941.

DI-BERNARDO, M. **História natural de uma comunidade de serpentes da borda oriental do Planalto das Araucárias, Rio Grande do Sul, Brasil**. 1998. 123 f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1998.

DUVALL, D.; GUILLETTE, L. J.; JONES, R. E. Environmental control of reptilian reproductive cycles. In : GANS, C. ; POUGH, H. F. **Biology of the reptilia**. London: Academic Press, 1982. p. 201-231.

ECKSTUT, M. E.; SEVER, D. M.; WHITE, M. E.; CROTHER, B. I. Phylogenetic analysis of sperm storage in female Squamates. In: DAHNOF, L. T. **Animal reproduction: New research developments**. New York: Nova Science Publishers, 2009. p. 185-218.

FERNANDEZ, G. S. M. **Eponímia e Etimologia**. São Paulo: Editora Plêiade, 1999.

FOWLER, I. R.; SALOMÃO, M. G.; JORDÃO, R. S. A description of the female reproductive cycle in four species from the neotropical colubrid snake *Philodryas* (Colubridae, Xenodontinae). **The Snake**, v. 28, p. 71-78, 1998.

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

FOX, W.; DESSAUER, H. C. The single right oviduct and other urogenital structures of female *Typhlops* and *Leptotyphlops*. **Copeia**, n. 2, p. 590-597, 1962.

FOX, W. Special tubules for sperm storage in female lizards. **Nature**, v. 198, p. 500-5001, 1963.

FREIRE, E. M. X. Geographic distribution. *Oxyrhopus guibei*. **Herpetological Review**, v. 30, p. 55, 1999.

FROTA, J. G. **Biologia reprodutiva e dieta de *Liophis jaegeri jaegeri* (Günther, 1858) (Serpentes, Colubridae, Xenodontinae)**. 2005. 43 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2005.

GABE, M.; SAINT-GIRONS, H. Contribution à la morphologie comparée du cloaque et des glandes épidermoïdes de la région cloacale chez les lépidosauriens. **Mémoires du Museum National d'Histoire Naturelle**, v. 23, p. 149-332, 1965.

GIACOMINI, E. Materiaux pour l'étude du development du Seps *Chalcides*. **Archives Italiennes de Biologie**, v. 16, 332-359, 1891.

GIACOMINI, E. Sull'ovidutto del Sauropsidi. **Monitore Zoologico Italiano**, v. 4, p. 202-265, 1893.

GIERSBERG, H. Untersuchungen über physiologie und histologie des eileiters der reptilien und vögel; nebst eimen beitrage zur fasergenese. **Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie**, v. 70, p. 1-97, 1922.

GIRLING, J. E.; CREE, A.; GUILLETTE, L. Oviductal structure in a viviparous New Zealand gecko, *Hoplodactylus maculatus*. **Journal of Morphology**, v. 234, p. 51-68, 1997.

GIRLING, J. E.; CREE, A.; GUILLETTE, L. J. Oviductal structure in four species of gekkonid lizard differing in parity mode and eggshell structure. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, 139-154, 1998.

- 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.
- GIST, D. H.; JONES, J. M. Sperm storage within the oviduct of turtles. **Journal of Morphology**, v. 199, p. 379-384, 1989.
- GIST, D. H.; CONGDON, J. D. Sperm storage as a reproductive tactic in turtles. **Journal of Experimental Zoology**, v. 282, p. 526-534, 1998.
- GIST, D. H.; BAGWILL, A.; LANCE, V.; SEVER, M. D.; ELSEY, R. M. Sperm storage in the oviduct of the american Alligator. **Journal of Experimental Zoology**, v. 309, p. 581-87, 2008.
- GREER, A. E. On the adaptative significance of the loss of an oviduct in reptiles. **Proceeding of the Linnean Society of London**, v. 101, p. 242-249, 1976.
- GUILLETTE, 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, p. 145-159, 1989.
- HALPERT, A. P.; GARSTKA, W. R.; CREWS, D. Sperm transport and storage and its relation to the annual sexual cycle of the female red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*. **Journal of Morphology**, v. 174, p. 149-59, 1982.
- HARTMANN, P. A.; MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of the southern Brazilian pitviper *Bothrops neuwiedii pubescens* (Serpentes, Viperidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 25, p. 77-85, 2004.
- HARTMANN, P. A.; MARQUES, O. A. V. Diet and habitat use of two sympatric species of *Philodryas* (Colubridae), in South Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 25, p. 25-31.2005.
- HATTAN, L. R.; GIST, D. H. Seminal receptacles in the eastern box turtle, *Terrapene carolina*. **Copeia**, n. 3, p. 505-510, 1975.
- HEULIN, B.; STEWART, J. R.; SURGET-GROBA, Y.; BELLAUD, P.; JOUAN, F.; LANCIEN, G.; DEUNFF, J. Development of the uterine shell glands during the preovulatory and early gestation periods in Oviparous and Viviparous *Lacerta vivipara*. **Journal of Morphology**, v. 266, p. 80-93, 2005.
- HOFFMAN, L. H. Placentation in the garter snake *Thamnophis sirtalis*. **Journal of Morphology**, v. 131, p. 57-88, 1970.
- HOFFMAN, L. H.; WIMSATT, W. A. Histochemical and electron microscopic observations on the sperm receptacles in the garter snake oviduct. **American Journal of Anatomy**, v. 134, p. 71-96, 1972.
- JACOBI, L. Ovoviviparie bei einheimishchen eideshsen. **Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie**, v. 148, p. 401-464, 1936.

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

JORDÃO, R. S.; BIZERRA, A. F. Reprodução, dimorfismo sexual e atividade de *Simophis rhinostoma* (Serpentes, Colubridae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 56, p. 507-512, 1995.

JUNQUEIRA, L. C. Histology revisited - Technical improvement promoted by the use of hydrophilic resin embedding. **Ciência e Cultura**, v. 47, p. 92-95, 1995.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical Journal**, v. 11, p. 447-55, 1979.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2012.

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

KARR, L. T.; PITNICK, S. Sperm competition: defining the rules of engagement. **Current Biology**, v. 9, p. 787-90, 1999.

KASTURIRANGAN, L. R. Placentation in the sea snake *Enhydrina schistose* (Daudin). **Proceedings of the Indian Academic Society**, v. 34, p. 1-32, 1951a.

KASTURIRANGAN, L. R. The allantoaplacenta of the sea snake *Hydrophis cyanocinctus* Daudin. **Journal of the Zoological Society of India**, v. 2, p. 277-290, 1951b.

LANCE, V.; LOFTS, B. Studies on the annual reproductive cycle of the female cobra, *Naja naja*. **Journal of Morphology**, v. 157, p. 161-181, 1978.

LICHT, P. Reptiles. In: LAMMING, G. E. **Marshall's physiology of reproduction**. Edinburg: Churchill Livingstone, 1984. p. 206-282.

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

MARINHO, C. E.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; YAMASAKI, S. C.; SILVEIRA, P. F. Peptidase activities in the sêmen from the ductus deferens and uterus of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 179, p. 635-642, 2009.

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

- MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; RODRIGUES, M. G.; CAMARGO, R. Mating and reproductive cycle in the neotropical colubrid snake *Chironius bicarinatus*. **South American Journal of Herpetology**, v. 4, n. 1, p. 76-80, 2009.
- MARQUES, O. A. V.; ETEROVIC, A.; ENDO, W. Seasonal activity of snakes in the Atlantic forest in southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 22, p. 103-111, 2001.
- MARQUES, O. A. V.; MURIEL, A. P. Reproductive biology and food habits of the swamp racer *Mastigodryas bifossatus* from the southeastern South America. **Herpetological Journal**, v. 17, p. 104-109, 2007.
- MASSON, G. R.; GUILLETTE, L. J. Changes in oviductal vascularity during the reproductive cycle of three oviparous lizards (*Eumeces obsoletus*, *Sceloporous undulatus*, *Crotaphytus collaris*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 80, p. 361-371, 1987.
- MATHIES, T. Reproductive cycle of tropical snakes. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Enfield: CRC Press, 2011. p. 511-550.
- MATHIES, T.; CRUZ, J. A.; LANCE, V. A.; SAVIDGE, J. A. Reproductive biology of male Brown treesnakes (*Boiga irregularis*) on Guam. **Journal of Herpetology**, v. 44, p. 209-221, 2010.
- MEAD, R. A.; EROSCHENKO, 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.
- MOSSMAN, H. W. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. **Carnegie of Institute Contributions Embriology**, v. 26, p. 129-246, 1937.
- OLSSON, M.; MADSEN, T. Sexual selection and sperm competition in reptiles. In: BIRKHEAD, T. R.; MOLLER, A. P. **Sperm Competition and Sexual Selection**. London: Academic Press., 1998. p. 503-577.
- ORZAK, S. H.; SOBER, E. Adaptation, phylogenetic inertia, and the method of controlled comparisons. In: _____. **Adaptationism and optimality**. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. p. 45-63.
- PALMER, B. D.; GILLETTE, L. J. Oviductal proteins and their influence on embryonic development in birds and reptiles. In: FERGUSON, M. W. J.; DEEMING, D. C. **Environmental influences on ovarian and reptilian embryonic development**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 29-46.
- PASSOS, P.; FERNANDES, P. S. Geographic distribution. *Philodryas patagoniensis*. **Herpetological Review**, v. 33, p. 69, 2002.
- PERKINS, M. J.; PALMER, B. D. Histology and functional morphology of the oviduct of an oviparous snake, *Diadophis punctatus*. **Journal of Morphology**, v. 227, p. 67-79, 1996.

PIZZATTO, L.; CANTOR, M.; OLIVEIRA, J.; MARQUES, O. A. V.; CAPOVILLA, V.; MARTINS, M. Reproductive ecology of Dipsadine snakes, with emphasis on South American species. **Herpetologica**, v. 64, p. 168-79, 2008.

PIZZATTO, L.; MARQUES, O. A. V. Interpopulational variation in reproductive cycle and activity of the water snake *Liophis miliaris* (Colubridae) in Brazil. **Herpetological Journal**, v. 16, p. 353-362, 2006.

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

POPE, C. H. Copulatory adjustment in snakes. **Zoological Series of Field Museum of Natural History**, v. 24, p. 249-252, 1941.

ROBB, J. The internal anatomy of *Typhlops* Schneider (Reptilia). **Australian Journal of Zoology**, v. 8, p. 181-216, 1960.

ROBB, J.; SMITH, H. M. The systematic position of the group of snake genera allied to *Anomalepis*. **Natural History Miscellaneous**, v. 184, p. 1-8, 1966.

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

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

SACCHI, M. Contribution à l'histologie de l'oviducte des sauroscides. **Archives Italiennes de Biologie**, v. 9, p. 267-284, 1888.

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

SAINT-GIRONS, H. Presence de receptacles seminaux chez les cameleons. **Beaufortia**, v. 9, p. 165-72, 1962.

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

SAINT-GIRONS, H. Sperm survival and transport in the female genital tract of reptiles. In: HAFEZ, E. S. E.; THIBAUT, C. G. **The Biology of Spermatozoa**. Basel: S. Karger, 1975. p. 106-13.

SANCHEZ-MARTÍNEZ, P. M.; RAMÍREZ-PINILLA, M. P. ; MIRANDA-ESQUIVEL, D. R. Comparative histology of the vaginal-cloacal region in Squamata and its phylogenetic implications. **Acta Zoologica**, v. 88, p. 289-307, 2007.

SASA, M. Distribution and reproduction of the grey earth snake *Geophis brachycephalus* (Serpentes-Colubridae) in Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v. 41, p. 295-297, 1993.

SAZIMA, I.; ABE, A. S. Habits of five Brazilian snakes with coral snake pattern including a summary of defensive tactics. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 26, p. 159-169, 1991.

SCHUETT, G. W. Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers? In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE, E. D. **Biology of pitvipers**. Tyler, Texas: Selva, 1992. p. 199-216.

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

SEIGEL, R. A.; FORD, N. B. Reproductive Ecology. In: _____. **Snakes: ecology and evolutionary biology**. New York: Macmillan, 1987. p. 210-252.

SEVER, D. M.; BRIZZI, R. Comparative biology of sperm storage in female salamanders. **Journal of Experimental Zoology**, v. 282, p. 460-476, 1998.

SEVER, D.; HAMLETT, W. Female Sperm Storage in Reptiles. **Journal of Experimental Zoology**, v. 187, p. 187-199, 2002.

SEVER, D. M.; HOPKINS, W. A. Oviductal sperm storage in the Ground Skink *Scincella laterale* Holbrook (Reptilia: Scincidae). **Journal of Experimental Zoology**, v. 301, p. 599-611, 2004.

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.

SEVER, D. M.; RYAN, T. J.; MORRIS, T.; PATTON, D.; SWAFFORD, S. Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*): Part II. The annual oviductal cycle. **Journal of Morphology**, v. 245, p. 146-160, 2000.

SHINE, R. Reproduction in Australian elapid snakes. II Female reproductive cycle. **Australian Journal of Zoology**, v. 25, p. 655-666, 1977a.

SHINE, R. Strangers in a strange land: ecology of the Australian colubrid snakes. **Copeia**, n. 1, p. 120-131, 1991.

SHINE, R. The reproductive biology of Australian reptiles; search for general patterns. In: GRIGG, G.; SHINE, R.; EHMANN. **Biology of Australian Frogs and Reptiles**. Chipping Norton-Australia: Surrey Beatty and Sons, 1985. p. 297-303.

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 Philogeny of Snakes**. Enfield: CRC Press, 2011. p. 347-409.

SIEGEL, D. S.; SEVER, D. M. Seasonal variation in the oviduct of female *Agkistrodon piscivorus* (Reptilia: Squamata): and Ultrastructural investigation. **Journal of Morphology**, v. 269, p. 980-97, 2008b.

SIEGEL, D. S.; SEVER, D. M. Sperm aggregations in female *Agkistrodon piscivorus* (Reptilia: Squamata): A histological and ultrastructural investigation. **Journal of Morphology**, v. 269, p. 189-206, 2008a.

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

SILVEIRA, M. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SOUZA, W. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. 3. ed. Rio de Janeiro: SBMM, 2011. p. 53-61.

SMITH, T. T. The modulation of sperm function by the oviductal epithelium. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 1102-1104, 1998.

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

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

TAKEWAKI, K.; HATTA, K. Effect of gonadectomy and hypophysectomy on the kidney and genital tract of a snake, *Natrix tigrina tigrina*. **Annotationes Zoologicae Japonenses**, v. 20, p. 4-8, 1941.

TOURMENTE, M.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E. R. S.; GIOJALAS, L. C.; CHIARAVIGLIO, M. Sperm competition and reproductive mode influence sperm dimensions and structure among snakes. **Evolution**, v. 63, p. 1-12, 2009.

TRYON, V. W. Additional instances of multiple egg-clutch production in snakes. **Transactions Kansas Academic Sciences**, v. 87, p. 98-104, 1984.

URIBE, M. C. A.; GONZÁLEZ-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.

VIDAL, N.; KINDL, S. G.; WONG, A.; HEDGES, S. B. Phylogenetic relationships of xenodontine snakes inferred from 12S and 16S ribosomal RNA sequences. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 14, p. 389-402, 2000.

VINEGAR, A. Evolutionary implications of temperature induced anomalies of development on snake embryos. **Herpetologica**, v. 30, p. 72-74, 1977.

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

VITT, L. J. Ecology of an anuran-eating guild of terrestrial tropical snakes. **Herpetologica**, v. 39, p. 52-66, 1983.

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

WOODDING, F. B.; FLINT, A. P. F. Placentation. In: LAMMING, G. E. **Marshall's physiology of reproductive**. 4. ed. London: Chapman and Hall, 1994. p. 186.

ZAHER, H. Hemipenial morphology of the South American Xenodontinae snakes, with a proposal for a monophyletic Xenodontinae and a reappraisal of Colubroid hemipenis. **Bulletin of American Museum of Natural History**, v. 240, p. 1-168, 1999.

ZAHER, H.; GRAZZIOTIN, F. B.; CADLE, J. E.; MURPHY, R. W.; MOURA-LEITE, J. C.; BONATTO, S. L. Molecular phylogeny of advanced snakes (Serpentes-Caenophidia) with an emphasis on South American Xenodontines: a revised classification and descriptions on new taxa. **Papeis Avulsos de Zoologia**, v. 49, p. 115-153, 2009.

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

ZUG, J. R. **Herpetology, an Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**, San Diego: Academic Press, 1993.

Apêndice A – Municípios analisados em *L. miliaris*

Estado	Município	Latitude	Longitude
SC	SEARA	27° 8' 56"S	52° 18' 39"O
SC	PERITIBA	27° 22' 22"S	51° 54' 14"O
SC	PIÇARRAS	26° 45' 50"S	48° 40' 19"O
SC	TRÊS BARRAS	26° 06' 21"S	50° 19' 19"O
RS	CACHOEIRA DO SUL	30° 02' 20"S	52° 53' 38"O
RS	PLANALTO	27° 19' 44"S	53° 03' 32"O
RS	NOVA PETRÓPOLIS	29° 22' 33"S	51° 06' 50"O
RS	CAPIVARI DO SUL	30° 08' 42"S	50° 30' 54"O
RS	PALMARES DO SUL	30° 15' 28"S	50° 30' 36"O
RS	RIO GRANDE	32° 02' 06"S	52° 05' 56"O
RS	CAXIAS DO SUL	29° 10' 04"S	51° 10' 44"O
PR	CRUZ MACHADO	26° 01' 12"S	51° 20' 49"O
PR	PAULO FRONTIN	26° 02' 24"S	50° 50' 09"O
PR	SÃO MATEUS DO SUL	25° 52' 26"S	50° 22' 58"O
SP	SÃO CAETANO DO SUL	23° 37' 22"S	46° 33' 03"O
SP	SÃO PAULO	23° 32' 52"S	46° 38' 09"O
SP	SANTANA DE PARNAÍBA	23° 26' 38"S	46° 55' 04"O
SP	ATIBAIA	23° 07' 01"S	46° 33' 00"O
SP	GUARULHOS	23° 27' 46"S	46° 31' 58"O
SP	CAIEIRAS	23° 21' 50"S	46° 44' 27"O
SP	ITAPECERICA DA SERRA	23° 43' 12"S	46° 50' 56"O
SP	PERUÍBE	24° 19' 12"S	46° 59' 52"O
SP	IBIÚNA	23° 39' 21"S	47° 13' 22"O
SP	OSASCO	23° 31' 58"S	46° 47' 31"O
MG	BAMBUÍ	20° 00' 21"S	45° 58' 37"O
MG	CACHOEIRA DE MINAS	22° 21' 18"S	45° 46' 44"O
MG	BELO HORIZONTE	19° 49' 01"S	43° 57' 21"O
MG	BERILO	16° 57' 07"S	42° 27' 57"O
MG	VÁRZEA DA PALMA	17° 35' 52"S	44° 43' 51"O
BA	BELMONTE	15° 51' 46"S	38° 52' 58"O
BA	SANTA LUZIA	15° 25' 44"S	39° 20' 02"O
BA	ITACARÉ	14° 16' 40"S	38° 59' 49"O
BA	ITAJU DO COLÔNIA	15° 08' 34"S	39° 43' 26"O
BA	ITORORÓ	15° 07' 01"S	40° 04' 12"O
BA	ILHÉUS	14° 47' 20"S	39° 02' 56"O
BA	ITABUNA	14° 47' 09"S	39° 16' 48"O
BA	ITAGIBÁ	14° 17' 02"S	39° 50' 34"O
BA	SALVADOR	12° 58' 15"S	38° 30' 39"O

Apêndice B – Municípios analisados para as amostras de *O. guibei*

Estado	Município	Latitude	Longitude
SP	ITU	23° 15' 50"S	47° 17' 56"O
SP	SERRA NEGRA	22° 36' 43"S	46° 42' 03"O
SP	ITUPEVA	23° 09' 10"S	47° 03' 28"O
SP	EMBU	23° 38' 56"S	46° 51' 07"O
SP	MOGI DAS CRUZES	23° 31' 22"S	46° 11' 16"O
SP	COTIA	23° 36' 14"S	46° 55' 08"O
SP	ITAPEVI	23° 32' 56"S	46° 56' 24"O
SP	JUQUITIBA	23° 55' 55"S	47° 40' 48"O
SP	VARGEM GRANDE PAULISTA	23° 36' 10"S	47° 15' 36"O
SP	SÃO PAULO	23° 32' 52"S	46° 38' 09"O
SP	CAPIVARI	22° 59' 42"S	47° 30' 28"O
SP	MONTE MOR	22° 56' 49"S	47° 18' 57"O
SP	SÃO JOSÉ DOS CAMPOS	23° 10' 44"S	45° 53' 13"O
SP	ARAÇARIGUAMA	23° 26' 20"S	47° 36' 36"O
SP	SÃO BERNARDO DO CAMPO	23° 41' 38"S	46° 33' 54"O
PR	PARANAVAÍ	23° 04' 22"S	52° 27' 54"O
PR	APUCARANA	23° 33' 36"S	51° 27' 39"O
PR	CAMPO MOURÃO	24° 27' 36"S	52° 22' 58"O
PR	GUAÍRA	24° 48' 00"S	54° 15' 21"O
PR	ARAUCÁRIA	25° 35' 34"S	49° 24' 36"O
PR	TUNEIRAS DO OESTE	23° 52' 15"S	52° 52' 33"O
PR	CASCADEL	24° 57' 21"S	53° 27' 18"O
MG	BELO HORIZONTE	19° 49' 01"S	43° 57' 21"O
MG	ITABIRA	19° 37' 08"S	43° 13' 37"O
MG	BERILO	16° 57' 07"S	42° 27' 57"O
BA	ILHÉUS	14° 47' 20"S	39° 02' 56"O
BA	BARRO ALTO	11° 45' 39"S	41° 54' 43"O
BA	AURELINO LEAL	14° 19' 01"S	39° 19' 37"O
BA	ITAJU DO COLÔNIA	15° 08' 34"S	39° 43' 26"O
BA	URUÇUCA	14° 35' 34"S	39° 17' 02"O
BA	GONGOGI	14° 19' 19"S	39° 27' 54"O
BA	ITACARÉ	14° 16' 40"S	38° 59' 49"O
BA	PALMEIRAS	12° 31' 44"S	41° 33' 32"O
BA	RIO DE CONTAS	13° 34' 44"S	41° 48' 39"O
BA	JEQUIÉ	13° 51' 28"S	40° 05' 02"O

Apêndice C – Municípios analisados para as amostras de *P. patagoniensis*

Estado	Município	Latitude	Longitude
RS	SÃO FRANCISCO DE PAULA	29° 26' 52"S	50° 35' 02"O
RS	RIO GRANDE	32° 02' 06"S	52° 05' 56"O
RS	CANELA	29° 21' 57"S	50° 48' 57"O
RS	GUAÍBA	30° 06' 50"S	51° 19' 30"O
RS	CACHOEIRA DO SUL	30° 02' 20"S	52° 53' 38"O
RS	PALMARES DO SUL	30° 15' 28"S	50° 30' 36"O
RS	GENERAL CÂMARA	29° 54' 18"S	51° 45' 36"O
RS	CAXIAS DO SUL	29° 10' 04"S	51° 10' 44"O
RS	BARRA DO RIBEIRO	30° 17' 27"S	51° 18' 03"O
RS	VIAMAO	30° 04' 51"S	51° 13' 48"O
SC	TRÊS BARRAS	26° 06' 21"S	50° 19' 19"O
SC	PORTO UNIÃO	26° 14' 16"S	51° 04' 40"O
SC	SÃO MATEUS DO SUL	25° 52' 26"S	50° 22' 58"O
SC	RIO NEGRO	26° 06' 21"S	49° 47' 52"O
PR	UNIÃO DA VITÓRIA	26° 13' 48"S	51° 51' 36"O
PR	GENERAL CARNEIRO	26° 25' 40"S	51° 18' 57"O
SP	GUARULHOS	23° 27' 46"S	46° 31' 58"O
SP	ITAPEVI	23° 32' 56"S	46° 56' 24"O
SP	ITUPEVA	23° 09' 10"S	47° 03' 28"O
SP	SÃO PAULO	23° 32' 52"S	46° 38' 09"O
SP	SANTANA DE PARNAÍBA	23° 26' 38"S	46° 55' 04"O
SP	JUNDIAÍ	23° 11' 36"S	46° 53' 02"O
SP	BARUERI	23° 30' 39"S	46° 52' 33"O
MG	CONCEIÇÃO DA BARRA DE MINAS	21° 07' 44"S	44° 28' 19"O
MG	NOVA PONTE	19° 08' 09"S	47° 40' 58"O
MG	BOM DESPACHO	19° 44' 09"S	45° 15' 07"O
MG	CORDISBURGO	19° 07' 30"S	44° 19' 15"O
MG	UBERLÂNDIA	18° 55' 08"S	48° 16' 37"O

Apêndice D – Municípios analisados para *T. dorsatus*

Estado	Município	Latitude	Longitude
RS	NOVA BASSANO	28° 43' 26"S	51° 42' 18"O
RS	PARAÍSO DO SUL	29° 40' 08"S	53° 08' 56"O
RS	NOVA PETRÓPOLIS	29° 22' 33"S	51° 06' 50"O
RS	TAQUARA	29° 39' 03"S	50° 46' 51"O
RS	VIAMAO	30° 04' 51"S	51° 13' 48"O
SC	PORTO UNIÃO	26° 14' 16"S	51° 46' 48"O
SC	CAÇADOR	26° 46' 30"S	51° 00' 54"O
PR	UNIÃO DA VITÓRIA	26° 13' 48"S	51° 51' 36"O
SP	IBIÚNA	23° 39' 21"S	47° 13' 22"O
SP	EMBU-GUAÇU	23° 49' 55"S	46° 48' 39"O
SP	EMBU	23° 38' 56"S	46° 51' 07"O
SP	ATIBAIA	23° 07' 01"S	46° 33' 00"O
SP	JANDIRA	23° 31' 40"S	46° 54' 10"O
SP	ITAPEVI	23° 32' 56"S	46° 56' 02"O
SP	SÃO BERNARDO DO CAMPO	23° 41' 38"S	46° 33' 54"O
SP	RIBEIRÃO PIRES	23° 42' 39"S	46° 24' 46"O
SP	MAIRINQUE	23° 32' 45"S	47° 10' 58"O
SP	SÃO PAULO	23° 32' 52"S	46° 38' 09"O
SP	COTIA	23° 36' 14"S	46° 55' 08"O
SP	ITAPECERICA DA SERRA	23° 43' 12"S	46° 50' 56"O

Apêndice E – Exemplares de *Liophis miliaris* (cobra da água) analisados

MCT-PUC (RS) - Museu de Ciência e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica – 5106, 5680, 7142, 7547, 11427, 12718, 12726, 14119, 14279, 14232, 14506, 16626, 17038, 17043, 17048, 17049, 17051, 17053, 17055.

FUNED (MG) - Fundação Ezequiel Dias – 131, 140, 665, 970, 1430, 2109.

IB (SP) – Instituto Butantan (Laboratório de Ecologia e Evolução) – 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 (*).

MZUFBA (BA) - Museu de Zoologia da Universidade Federal da Bahia – 534, 1939.

CEPLAC (BA) - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – 07, 80, 195, 242, 301, 349, 2459, 2590, 2721, 2816, 2822, 2917, 2919, 3333, 3771.

(*) Animais em processo de tombamento no Instituto Butantan.

Apêndice F – Exemplares de *Oxyrhopus guibei* (falsa coral) analisados

MCT-PUC (RS) - Museu de Ciência e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica – 5388, 10302, 16413.

MNHCI (PR) - Museu de História Natural Capão da Imbuia – 652, 953, 1126, 1151, 1152, 2391, 2696, 5866, 6171, 6544, 9940.

FUNED (MG) - Fundação Ezequiel Dias – 1662, 1669, 1673, 1794, 2325.

IB (SP) – Instituto Butantan (Laboratório de Ecologia e Evolução) – 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 (*).

MZUFBA (BA) - Museu de Zoologia da Universidade Federal da Bahia – 1373, 1381.

MZUESC (BA) - Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz – 231, 247, 2383, 2456, 2685, 3138, 3223, 4260, 5689.

CEPLAC (BA) - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – 495, 594, 732, 1209, 1438.

(*) Animais em processo de tombamento no Instituto Butantan.

Apêndice G – Exemplares de *Philodryas patagoniensis* (parelheira) analisados

MCT-PUC (RS) - Museu de Ciência e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica – 10948, 11285, 11376, 11414, 12044, 12095, 12552, 12782, 14394, 14513, 14567, 14650, 15712, 16145, 16960, 16965, 16978, 16980, 17013, 17017, 17837.

FUNED (MG) - Fundação Ezequiel Dias – 195, 198, 772, 774, 1637, 1942, 2237.

IB (SP) – Instituto Butantan (Laboratório de Ecologia e Evolução) – 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13 (*).

(*) Animais em processo de tombamento no Instituto Butantan.

Apêndice H – Exemplares de *Tomodon dorsatus* (cobra espada) analisados

MCT-PUC (RS) - Museu de Ciência e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica – 10514, 11204, 12150, 12253, 12254, 12589, 12790, 14765, 14879, 17396, 17399, 17412, 17413, 17417, 17419, 17422, 17425, 17426, 17394, 18273, 18295.

IB (SP) – Instituto Butantan (Laboratório de Ecologia e Evolução) – 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 (*).

(*) Animais em processo de tombamento no Instituto Butantan.