IGOR STEFAN POPOVIC FEDERSONI

Correlação dos estágios embrionários e a morfologia do
corpo lúteo e placenta de *Crotalus durissus* (VIPERIDAE)

São Paulo

2016

IGOR STEFAN POPOVIC FEDERSONI

**Correlação dos estágios embrionários e a morfologia do corpo
lúteo e placenta de *Crotalus durissus* (VIPERIDAE)**

São Paulo

2016

IGOR STEFAN POPOVIC FEDERSONI

**Correlação dos estágios embrionários e a morfologia do corpo lúteo e
placenta de *Crotalus durissus* (VIPERIDAE)**

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

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Selma Maria Almeida Santos

São Paulo

2016

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3349 FMVZ	<p>Federsoni, Igor Stefan Popovic Correlação dos estágios embrionários e a morfologia do corpo lúteo e placenta de <i>Crotalus durissus</i> (VIPERIDAE) / Igor Stefan Popovic Federsoni. -- 2016. 78 f. : il.</p> <p>Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.</p> <p>Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.</p> <p>Orientador: Profa. Dra. Selma Maria Almeida Santos.</p> <p>1. <i>Crotalus durissus</i>. 2. Prenhez. 3. Corpo lúteo. 4. Placenta corioalantóica. 5. Feto. I. Título.</p>
----------------	--

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Correlação dos estágios embrionários e a morfologia do corpo lúteo e placenta de *Crotalus durissus* (VIPERIDAE)”, protocolado sob o nº 3078/2013, utilizando 10 (dez) cascavéis, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Selma Maria Almeida Santos, foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research “Correlation of embryonic stages and morphology of the corpus luteum and placenta in *Crotalus durissus* (VIPERIDAE)”, protocol number 3078/2013, utilizing 10 (ten) snakes, under the responsibility Profa. Dra. Selma Maria Almeida Santos, was approved in the meeting of day 8/14/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 14 de agosto de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FEDERSONI, Igor Stefan Popovic

Título: **Correlação dos estágios embrionários e a morfologia do corpo lúteo e placenta de *Crotalus durissus* (VIPERIDAE)**

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

Agradecimentos

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

A esta universidade, a PROEX/CAPES pela bolsa concedida, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, eivado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presentes.

Ao minha orientadora Selma, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções, discussões e incentivos.

Ao animais que proporcionaram um entendimento maior sobre a reprodução e fisiologia de sua espécie.

Aos meus pais e irmãos que sempre estiveram ao meu lado dando amor, incentivo e apoio incondicional

A minha esposa Aline agradeço de coração por tudo, paciência, compreensão e auxílio nos momentos difíceis. Por sempre ter acreditado e confiado em mim.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

RESUMO

FEDERSONI, I. S. P. **Correlação dos estágios embrionários e a morfologia do corpo lúteo e placenta de *Crotalus durissus* (VIPERIDAE)**. [Correlation of embryonic stages and morphology corpus luteum and placenta of *Crotalus durissus* (VIPERIDAE)]. 2016. 78 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Atualmente, grande parte do conhecimento adquirido sobre reprodução de serpentes, advém de estudos levados a efeito na América do Norte e Europa, com animais de regiões temperadas; e, na Austrália, com Elapídeos tropicais. No presente estudo foram utilizadas dez serpentes fêmeas prenhes de *Crotalus durissus* (Viperidae) de região neotropical, com o objetivo de descrever e correlacionar a morfologia do corpo lúteo, placenta e estágio fetal. Com isso pode-se inferir também, o tempo de prenhez. As técnicas realizadas para essa descrição e correlação foram: biometria macroscópica das fêmeas e suas estruturas; microscopia de luz com coloração de hematoxilina-eosina e microscopia eletrônica de varredura. Foram coletados no total 124 corpos lúteos e 116 placentas, onde observou-se que a cascavel possui o corpo lúteo de caráter ovulatório e a placenta do tipo corioalantóica evolvida por uma delgada membrana da casca do ovo. Concluiu-se que o tamanho padrão da superfície dos corpos lúteos para uma prenhez normal é de 18 a 34 mm² e que há um corpo lúteo para cada ovo, independente se está fertilizado ou atrésico, porém os ovos atrésicos não possuem placenta. Pela primeira vez foi possível visualizar a disposição estrutural dos filamentos calcários em forma de trama na membrana da casca do ovo. Foi inferida uma classificação da placenta em três estágios I, II e III de acordo com a morfologia e aumento das vilosidades apresentadas entre placenta e útero; e a partir da identificação do estágio de desenvolvimento embrionário e fetal pode-se inferir o tempo de prenhez em *C. durissus*, classificadas em três terços, inicial, médio e final, evidenciando que existe uma correlação entre a evolução dos estágios placentários com desenvolvimento fetal, conforme a evolução gradual da prenhez.

Palavras-chave: *Crotalus durissus*. Prenhez. Corpo lúteo. Placenta corioalantóica. Feto.

ABSTRACT

FEDERSONI, I. S. P. **Correlation of embryonic stages and morphology corpus luteum and placenta of *Crotalus durissus* (VIPERIDAE).** [Correlação dos estágios embrionários e a morfologia do corpo lúteo e placenta de *Crotalus durissus* (VIPERIDAE)]. 2016. 78 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

At de present time, great part of snake reproduction knowledge results from researches realized in North America and Europe, with temperate region animals; in Australia with tropical Elapides. At this present research, ten pregnant females of the snake *Crotalus durissus* (Viperidae), from Neotropical Region, were utilized. The main goal is to correlate the morphology, *corpus luteum*, placenta and fetal development. Then, it is also easy to deduce the pregnancy time. The techniques performed for this description and correlation were females macroscopic biometry and their structures; light microscopy with hematoxiline-eosine color and electronic scanning microscopy. 124 *corpora lutea* and 116 placentas were collected. In those samples could be observed that rattlesnakes have an ovulatory corpus luteum and a corioalantoic placenta wrapped by a slender membrane of the eggshell. Clearly the conclusion is that the normal standard size surface corpus luteum for a normal pregnancy is from 18 to 34mm² and that there is a corpus luteum for each egg, independently if it is fertilized or atresic; but, these atresic eggs have not placenta. For the first time it was possible to visualize the structural arrangement of the calcareous filaments in shaped frame in the eggshell membrane. It was inferred a placenta classification in three stages: I, II and III according to the morphology and increased vilosiddes presented among placenta and uterus; and, from the identification of embryonic and fetal development stage we can infer the time pregnancy in *C. durissus*, classified in three thirds, initial, middle and final, indicating that there is a correlation between the evolution of placental stage with fetal development, as the gradual evolution of pregnancy.

Keywords: *Crotalus durissus*. Pregnancy. Corpus luteum. Placenta corioalantoic. Foetus

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Mensuração do Comprimento Rostro Cloacal (CRC).....	33
Figura 2 -	Mensuração do Comprimento Caudal (CC)	33
Figura 3 -	Útero de <i>C. durissus</i> contendo ovos e respectivos fetos e ovos atrésicos.....	35
Figura 4 -	Aspecto macroscópico de corpos lúteos em <i>C. durissus</i>	36
Figura 5 -	Mensuração do comprimento do corpo lúteo	36
Figura 6 -	Aspecto macroscópico do folículo primário.....	37
Figura 7 -	Aspecto microscópico do folículo primário. Aumento = 40x.....	37
Figura 8 -	Aspecto macroscópico do folículo recém ovulado	38
Figura 9 -	Morfologia do corpo lúteo. (A) aumento = 40x (B) aumento = 100x....	39
Figura 10 -	Células que constituem o corpo lúteo. (A) aumento = 100x (B) aumento = 400x	41
Figura 11 -	Estrutura endometrial e miometrial no período pró-prenhez de <i>C.</i> <i>durissus</i> . Aumento = 100x.....	42
Figura 12 -	Visualização das estrias calcárias da membrana da casca do ovo em <i>C. durissus</i> . Aumento = 400x	43
Figura 13 -	Morfologia do epitélio uterino e vilosidades placentárias. Aumento=100x.....	44
Figura 14 -	Morfologia da placenta em estágio II. Aumento = 100x.....	45
Figura 15 -	Morfologia da placenta em estágio III. (A) aumento = 40x; (B) aumento = 100x	46
Figura 16 -	Estrutura e disposição da membrana da casca do ovo e alantocórion.....	47
Figura 17 -	Vascularização uterina em microscopia eletrônica de varredura.....	48
Figura 18 -	Vascularização entre útero e corioalantóide.....	49

Figura 19 - Vascularização corioalantóica. Vaso seccionado com presença de hemácias.....	49
Figura 20 - Fetos de <i>C. durissus</i> nos estágios 34 a 35,5.....	51
Figura 21 - Feto de <i>C. durissus</i> nos estágios 36 a 38,5.....	52
Figura 22 - Feto de <i>C. durissus</i> nos estágios 40 a 42.....	53
Figura 23 - Feto de <i>C. durissus</i> no estágio 42	53
Figura 24 - Fêmea de <i>C. durissus</i> em estágio inicial de prenhez	54
Figura 25 - Feto de <i>C. durissus</i> em estágio 34,5	55
Figura 26 - Fêmea de <i>C. durissus</i> em estágio médio de prenhez.....	56
Figura 27 - Feto de <i>C. durissus</i> em estágio 38,5	56
Figura 28 - Feto de <i>C. durissus</i> em estágio 36	57
Figura 29 - Fêmea de <i>C. durissus</i> em estágio final de prenhez.....	58
Gráfico 1 - Correlação comprimento total da serpente X número de ovos e corpos lúteos.....	59
Gráfico 2 - Correlação comprimento total da serpente X superfície do corpo lúteo	60
Gráfico 3 - Superfície do corpo lúteo (em mm ²) em ovos atrésicos e fertilizados	61
Gráfico 4 - Correlação estágio fetal X superfície do corpo lúteo	62
Gráfico 5 - Correlação estágio placentário X superfície do corpo lúteo	63
Gráfico 6 - Correlação estágio fetal X estágio placentário	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores biométricos das fêmeas prenhes de <i>Crotalus durissus</i>	32
Tabela 2 -	Quantidade de ovos e corpos lúteos das fêmeas prenhas de <i>Crotalus durissus</i>	34
Tabela 3 -	Classificação dos estágios fetais e placentários das fêmeas prenhes de <i>Crotalus durissus</i>	50
Tabela 4 -	Correlação dos resultados obtidos macro e microscopicamente	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
CC	Comprimento caudal
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Comprimento Total
CLA	Corpo lúteo atresico
CLO	Corpo lúteo ovulatório
CRC	Comprimento rostro cloacal
GH	Hormônio do crescimento
LH	Hormônio luteinizante
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mg/Kg	Miligramas por quilograma
mm	Milímetro
mm ²	Milímetros quadrados
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.2	HISTÓRIA NATURAL DE <i>Crotalus durissus</i> (CARACTERÍSTICAS, AMBIENTE, ALIMENTAÇÃO, REPRODUÇÃO)	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	VIVIPARIDADE EM RÉPTEIS	17
2.2	BIOLOGIA REPRODUTIVA DE SERPENTES VIVÍPARAS	18
2.3	ANATOMIA DO APARELHO REPRODUTOR FEMININO	18
2.4	FORMAÇÃO E ATUAÇÃO DO CORPO LÚTEO EM RÉPTEIS VIVÍPAROS	19
2.5	REGULADORES ENDÓCRINOS QUE PARTICIPAM DA FORMAÇÃO DO CORPO LÚTEO	21
2.6	PLACENTAÇÃO EM RÉPTEIS VIVÍPAROS	22
2.7	DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FETAL EM SERPENTES	22
3	OBJETIVO GERAL	24
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1	AQUISIÇÃO DOS ANIMAIS	25
4.2	EUTANÁSIA	25
4.3	BIOMETRIA.....	26
4.4	NECRÓPSIA E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	26
4.5	PREPARAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO PARA MICROSCOPIA DE LUZ DIRETA.....	27
4.5.1	Desidratação e inclusão de parafina.....	27
4.5.2	Microtomia e preparação das lâminas	28
4.5.3	Coloração dos Tecidos – Técnica de Hematoxilina-Eosina (HE)	28
4.6	PREPARAÇÃO DO ÚTERO E PLACENTA PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	29
4.7	LEITURA E IDENTIFICAÇÃO DOS ESTÁGIOS EMBRIONÁRIOS/FETAIS	30
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5	RESULTADOS	32

5.1	BIOMETRIA	32
5.2	MICROSCOPIA DE LUZ DIRETA	37
5.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	47
5.4	LEITURA E IDENTIFICAÇÃO DOS ESTÁGIOS EMBRIONÁRIOS/FETAIS	50
5.5	IDENTIFICAÇÃO DOS ESTÁGIOS DE PRENHEZ	53
5.6	CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS	58
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS.....	71
	ANEXO	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 ORIGEM E EVOLUÇÃO DOS SQUAMATA

A Ordem Squamata surgiu há aproximadamente 230 milhões de anos entre as Eras Paleozóica e Mesozóica. Nesse período seus ancestrais se congeminaram dando origem aos lagartos, serpentes e anfisbenídeos (CARROL, 1977).

A Ordem representa o maior grupo da Classe Reptilia, que confere 96,36% das espécies de répteis existentes no Planeta dividido em três subordens e 9.411 espécies: 183 Amphisbaenia; 5.796 Sauria e 3.432 Ophidia (UETZ, 2014).

Grande parte dos Squamata é tetrápode, porém a redução ou extinção dos membros foi um evento comum em lagartos. Nas serpentes e anfisbenídeos houve redução total (ZUG et al., 2001). Seu corpo é revestido por placas quitinosas e impermeáveis chamadas de escamas, que deram origem ao nome do Grupo em *Latim Squamatus* = escamado (WAREHAM, 2005). Os Squamata são predominantes no ambiente terrestre, porém há algumas espécies que habitam o ambiente aquático, como é o caso de algumas serpentes (HSIANG et al., 2015).

A caracterização diagnóstica de um ofídio se dá pela observação de alguns parâmetros evolutivos como: corpo cilíndrico e alongado; perda total de pálpebras superior e inferior, sendo a proteção ocular feita por um escudo quitinoso, homólogo ao tegumento da serpente, que recobrem seus olhos; ausência de sínfise mandibular auxiliando na ingestão de presas; e ausência de apêndices locomotores e cintura escapular, sendo que alguns gêneros mais basais apresentam resquício de cintura pélvica (POUGH et al., 2008).

1.2 HISTÓRIA NATURAL DE *Crotalus durissus* (CARACTERÍSTICAS, AMBIENTE, ALIMENTAÇÃO, REPRODUÇÃO)

A classificação do gênero *Crotalus* (LINNAEUS, 1758) situa-se na infra-ordem Alethinophidea, superfamília Colubroidea, família Viperidae, subfamília Crotalinae e é composto por 27 espécies localizadas nas três Américas (CAMPBELL; LAMAR., 1989). No Brasil, reside apenas uma espécie do gênero denominada de *Crotalus durissus* dividida em seis subespécies: *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima*, *C. d. trigonicus* e *C. d. terrificus*. Esta serpente possui um porte relativamente grande podendo ultrapassar 1500 milímetros de comprimento (CAMPBELL; LAMAR, 1989; SOERENSEN, 1990; BASTOS et al., 2005).

O gênero *Crotalus* apresenta uma característica impar entre os répteis, pois a sua última vértebra caudal é modificada em forma rombuda, o que provoca, na ecdise, uma quebra da última escama caudal, deixando ali um fragmento em forma de anel, que se solidifica soldando-se firmemente. Numa segunda ecdise, forma-se outro anel igual ao primeiro e se prende àquele de maneira frouxa, permitindo-lhe certo movimento. À medida que as ecdises vão acontecendo, os anéis se encaixam aos anteriores, formando um guizo ou chocalho. Recebem esse nome, porque quando as serpentes se veem acuadas, agitam suas caudas; como as *Crotalus* têm esse guizo, esse movimento caudal provoca o som de um chocalho. Daí o se nome popular de Cascavel (cascavel = chocalho ou crótalo). Esse guizo é utilizado pela serpente para comunicar aviso de perigo ao agressor (BASTOS et al., 2005). Sua coloração também é peculiar mimetizando o ambiente onde vive. As escamas são castanhas claras, seu dorso é ornado por losangos ou rombos com margens brancas ou amareladas e seu centro com coloração castanha escura (CAMPBELL; LAMAR, 1989).

Habitam regiões antropizadas de ambientes secos e rochosos e/ou com vegetação baixa e áreas de campo aberto. Nas últimas décadas, a agropecuária e o desmatamento desregrado têm aumentado a formação e propagação dessas áreas, e conseqüentemente a população de roedores. Estes fazem parte da sua dieta, tornando propícia a ocorrência destas serpentes junto aos humanos e animais domésticos (BASTOS et al., 2005). São responsáveis por oito por cento dos acidentes ofídicos, denominados acidentes crotálicos, possuindo, em seu veneno,

diversas toxinas tais como: neurotóxicas, miotóxicas e coagulantes. Geralmente a intoxicação ocorre de maneira grave, pois esses animais raramente disferem o chamado bote seco ou bote sem peçonha (AZEVEDO-MARQUES et al., 1992).

O ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* mostra-se semelhante ao de outras cascavéis de regiões temperadas. Em fêmeas pode ser caracterizado pelo desenvolvimento dos folículos em estágios primário ou secundário, e os machos apresentam sinais ritualísticos pré-cópula como o combate (DESSAUER; FOX, 1959). Apresentam ciclo reprodutivo bienal sazonal com estágio de desenvolvimento folicular ativo, e o acasalamento se dá no período outonal (ALMEIDA-SANTOS et al., 1990).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VIVIPARIDADE EM RÉPTEIS

Grande parte do conhecimento adquirido atualmente sobre reprodução de serpentes advém de estudos levados a efeito na América do Norte e Europa, com animais de regiões temperadas, e, na Austrália, com Elapídeos tropicais (PIZZATTO et al., 2006). Hoje, sabe-se que existem diferenças entre os resultados dos estudos em serpentes de distintas regiões. Isto leva a falsas conclusões, visto que são animais de ecossistemas diferentes. É fácil perceber disparidades ao se cotejar dados sobre animais de outras regiões continentais (LIRA DA SILVA et al., 1994).

Admitindo-se que ecossistema se refere ao conjunto clima, temperatura, umidade relativa do ar, luminosidade, vegetação e diferenciados tipos de alimentação, todo esse processo está relacionado com sazonalidade do acasalamento, tipo de cortejo, quiescência, ovulação e postura ou parturição (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; PIZZATTO et al., 2006).

Serpentes vivíparas são mais comuns em climas temperados onde há um declínio considerável da temperatura em determinada época do ano. Sabe-se que nessas regiões, a temperatura corporal das fêmeas de ofídios é mais estável que a do solo. Alguns ambientes muito úmidos ou muito secos como pântanos ou clima de altitude, propiciaram a viviparidade, pois os ovos de serpentes ovíparas, não conseguiriam se desenvolver em condições extremas (SHINE, 1995; ANDREWS; MATHIES, 2000).

Algumas populações da serpente *Crotalus viridis oreganos* apresentam uma relação entre altitudes elevadas e menor taxa no tamanho médio da ninhada, também expressando ciclos reprodutivos mais prolongados (DILLER; WALLACE, 1984; DILLER; WALLACE, 2002).

Nessas circunstâncias as fêmeas sofreram algumas alterações morfofisiológicas. A membrana da casca do ovo diminuiu ou obteve completo retrocesso. Este fenômeno deu origem a um tipo de placentação, onde os embriões e fetos têm a capacidade de se desenvolver dentro do útero, até a fase de seu nascimento. Este mecanismo evolutivo, chamado de retenção de ovos, diminuiu a

mortalidade dos embriões em tais condições adversas (TINKLE; GIBBONS, 1977; SHINE, 1995).

2.2 BIOLOGIA REPRODUTIVA DE SERPENTES VIVÍPARAS

Em espécies vivíparas o ciclo reprodutivo ocorre de forma não contínua ou bienal sazonal (BONNET et al., 2001; PIZZATTO et al., 2006). Em *Crotalus* a periodicidade reprodutiva das fêmeas é baseada no estado nutricional, ou seja, a disponibilidade de alimentos propicia uma reserva energética ou aumento de gordura abdominal. Segundo Diller e Wallace (1984) é o principal fator que regula o ciclo reprodutivo.

A ovulação e a fertilização não apresentam sincronidade com o acasalamento que se dá na estação seca, entre os meses de abril a junho. As fêmeas, após o acasalamento, estocam o esperma devido a um entorse na região caudal do útero chamado de “utero muscular twisting” (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; BARROS et al., 2012). Essa torção permite que o esperma permaneça estocado no inverno entre os meses de julho a setembro (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997), enquanto que a ovulação e fertilização dos óvulos só ocorrem na estação chuvosa, entre os meses de outubro a dezembro e a parturição entre os meses de janeiro a março. O estágio de prenhez em *C. durissus* dura em média 155 dias originando 15 neonatos por ninhada (LIRA DA SILVA et al., 1994; ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002).

2.3 ANATOMIA DO APARELHO REPRODUTOR FEMININO

O complexo evolutivo que levou à fertilização interna e aos modos reprodutivos oviparidade e viviparidade desencadeou vários mecanismos de acasalamento, com modificações anatomofisiológicas e reprodutivas nas fêmeas. A anatomia dos órgãos reprodutores de *C. durissus* fêmea é formado por dois ovários

eu dois úteros que seguem paralelamente aos ovários sendo que, o útero direito é mais cranial e o esquerdo mais caudal. O útero é subdividido em três porções: 1- porção cranial: Infundíbulo; 2- porção medial: Útero Anterior; 3- porção caudal: Útero Posterior, onde ocorre o armazenamento do sêmen pelo fenômeno “*utero-muscular twisting*”. Esta estrutura apresenta-se em continuidade com a porção cranial da vagina, que é bilobada e onde ocorre a penetração e fixação do hemipênis (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; PIZZATTO et al., 2006; SIEGEL; SEVER, 2006).

Paralelo aos úteros, na região medial dorsal, seguem dois grandes vasos chamados de artérias uterinas que se originam da aorta dorsal. Essas artérias dividem-se em diversos ramos, que seguem em sentido dorso ventral envolvendo toda a estrutura com uma rede de artérias, arteríolas, veias e vênulas (YARON, 1985; GIRLING, 2002). Paralelo às artérias, arteríolas e capilares venosos segue outro par de veias calibrosas denominadas de veias uterinas, que têm sua origem a partir da veia cava posterior (YARON, 1985).

Todo esse complexo vascular serve como carreador e mediador hormonal dos diversos eventos anatomofisiológicos reprodutivos como estocagem de esperma, placentação, reabsorção de estruturas atrésicas, nutrição embrionária/fetal e parturição (YARON, 1985; ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002).

2.4 FORMAÇÃO E ATUAÇÃO DO CORPO LÚTEO EM RÉPTEIS VIVÍPAROS

Em praticamente toda evolução zoológica aconteceu o desenvolvimento de uma glândula transitória, que auxilia na prenhez secretando progesterona. Esta estrutura é denominada de corpo lúteo (GUILLETE; CREE, 1997), que aparece após a ovulação auxiliada pelo hormônio luteinizante (GIOMETTI et al., 2009). O processo de ovulação consiste em multiplicação mitótica das oogônias, chamada de vitelogênese primária ou contínua, dando origem ao oócito. A partir desta célula se dá início à vitelogênese secundária. Nessa fase ocorre a deposição de vitelo no oócito, onde as células da camada granulosa se hipertrofiam e hiperplasiam formando vesículas de proteínas e fosfolípidos, que são depositados no citoplasma em seu interior (LICHT, 1979).

Este carreamento de substâncias essenciais à vitelogênese ocorre devido ao contato da membrana vitelínica (Oolema) com as células da camada granulosa. Nesta fase há ação da hipófise e dos ovários liberando estrogênio e hormônio luteinizante (LH), que é acumulado no oócito pelo aumento da irrigação sanguínea periférica. Essa liberação de estrogênio também age no fígado induzindo a síntese de Vitelogenina (LICHT, 1979). A fase vitelogênica termina quando o oócito atinge o tamanho determinado para cada espécie. As células da camada granulosa diminuem sua atividade dando início à maturação nuclear do oócito, em seguida se desprende dando origem à ovulação (BROWNING, 1973; ROTHCHILD, 2003).

O processo de luteinização ocorre após o evento da ovulação e é classificado em dois momentos distintos:

1- Corpo Lúteo Atrésico (CLA): este tipo de corpo lúteo só é formado quando o folículo contendo o oócito inicia a fase vitelogênica. Ocorrendo a vitelogênese há a interrupção do crescimento do oócito e desintegração do núcleo. As células da camada granulosa sofrem hipertrofia e hiperplasia ocupando o oócito e retirando o vitelo por fagocitose e digestão (leucócitos cooperam na fagocitose). Esta etapa é chamada de Fase Alfa. Com a absorção do vitelo, o folículo se enche de células granulosas formando uma rede e dando-lhe aspecto amarelado. Logo após, a teca interna entra na rede trazendo consigo vasos sanguíneos, processo chamado de Fase Beta. Após este processo as células granulosas diminuem de tamanho, e pelo fenômeno de picnose se acumula um pigmento amarelo amarronzado. A absorção, então, continua, dando origem a um processo de degeneração e atrofia das células granulosas, deixando, ali, apenas a teca. Esta etapa se divide em duas fases, Fase Gama e Delta. Findo este evento há a formação do corpo lúteo. Por outro lado, a atresia remove os oócitos imaturos reabsorvendo-os, e esta reabsorção pode ocorrer também em folículos que sofreram vitelogênese. Este fenômeno pode ser causado por stress. O corpo lúteo atrésico ocorre frequentemente em animais de ciclos anuais como peixes e anfíbios (BROWNING, 1973).

2-Corpo Lúteo Ovulatório (CLO): a formação deste corpo lúteo é semelhante ao do CLA, diferenciando-se na Fase Beta, onde o CLO persiste por mais tempo, principalmente em espécies vivíparas. A vida útil deste corpo lúteo está diretamente relacionada ao tempo em que o óvulo fertilizado permanece no útero. Esta estrutura é mais observada em répteis (BROWNING, 1973).

2.5 REGULADORES ENDÓCRINOS QUE PARTICIPAM DA FORMAÇÃO DO CORPO LÚTEO

A formação do corpo lúteo não é mediada apenas pelo hormônio luteinizante (LH) e do crescimento (GH) secretados pela hipófise anterior. Observa-se um complexo endócrino e organizacional, onde atuam diversas substâncias em vias de sinalizações parácrinas e autócrinas para que ocorra a reorganização estrutural ovariana e angiogênese que auxiliam na formação e diferenciação celular e no aumento do fluxo sanguíneo para o transporte de elementos essenciais no momento em que o embrião irá sofrer sua implantação (BERISHA et al., 2000).

No período pré-ovulatório há um pico de LH que estimula não só o crescimento, mas também a maturação folicular e a ovulação. Esse pico pré-ovulatório de LH incentiva a luteinização de células da teca e da camada granulosa, orquestrando a mudança esteroidogênica em que o produto principal é a produção de progesterona (GIOMETTI et al., 2009).

Após a ovulação o LH fomenta a reestruturação ovariana provocando o rompimento da sua membrana basal, enquanto que as células da granulosa e da teca interna alastram-se sobre a cavidade folicular. Inicia-se a formação de uma pequena rede vascular que aumenta conforme o crescimento luteínico (DAMBER et al., 1987). Essas células, que estão em constante diferenciação e multiplicação, resultarão na formação do corpo lúteo, que será constituído por dois tipos celulares distintos: células pequenas originárias das células da teca; e células grandes que são arquitetadas a partir das células da camada granulosa (HANSEL; DOWD, 1986).

Em mamíferos a quantidade de progesterona que é secretada pelo corpo lúteo está diretamente relacionada à quantidade de receptores de LH, segundo Giometti et al. (2009). A progesterona produzida pelo corpo lúteo antagoniza o estradiol (BONNET et al. 2001). Este auxilia na vitelogênese e ovulação, enquanto que a progesterona auxilia na prenhez (GIRLING, 2002; GUILLETTE; CREE, 1997; LICHT, 1979) estimulando o crescimento e atividade das células secretórias do endométrio. O preparo do tecido endometrial é essencial para a implantação e manutenção do embrião durante a prenhez (GUARINO et al., 1998).

2.6 PLACENTAÇÃO EM RÉPTEIS VIVÍPAROS

A reprodução de répteis vivíparos difere de outros cordados não mamíferos, porém, há dois constituintes membranosos homólogos aos dos mamíferos placentários, o córion e o alantóide, que envolvem o embrião ou feto formando a placenta (YARON, 1985).

Com o preparo do tecido endometrial auxiliado pelo corpo lúteo, desenvolvem-se quatro anexos extra-embrionários: três que envolvem o embrião e um que nutre o embrião e/ou feto durante a prenhez. As membranas são classificadas como córion, alantóide, âmnio e saco vitelínico que são revestidas e protegidas pela delgada membrana da casca do ovo. Este conjunto proporciona a formação da placenta (BLACKBURN, 1993).

O tipo de placenta encontrada em *Crotalus* é a corioalantóica, ocorre pela fusão virtual do útero com o corioalantóide. Em Squamata vivíparos tem sido plausível a formação evolutiva da placenta corioalantóica pelo adelgaçamento e/ou desaparecimento da membrana da casca que envolve o ovo (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002). Este tipo de placenta possibilita a troca de gases e nutrientes materno-fetais por uma extensa rede vascular e grandes fenestrações contidas na membrana da casca do ovo (BLACKBURN, 1993; PARKER; MURPHY; THOMPSON, 2010).

2.7 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FETAL EM SERPENTES

O desenvolvimento embrionário e fetal tem sido muito estudado em espécies domésticas, desde a década de 50 com codornas (*Coturnix coturnix*), galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*) e alguns gêneros de répteis como iguanídeos e geckonídeos (WISE et al., 2009). Esses estudos auxiliam na obtenção de dados da origem e evolução dos animais, porém em répteis, há uma grande preocupação nas comparações de estudos, pois cada gênero possui peculiaridades na sua organogênese, formação e crescimento de estruturas (HUBERT, 1985).

Há poucas informações sobre o desenvolvimento e crescimento embrionário/fetal de serpentes. Grande parte dos trabalhos sobre esse tipo de desenvolvimento descrevem ofídios ou outros Squamata ovíparos, pela facilidade de obter o ovo para análise do embrião ou feto (BOUGHNER et al., 2007).

Nos ofídios ovíparos ou vivíparos é notada uma assimetria bilateral quanto à posição e quantidade de ovos/embriões nos úteros quando comparadas com seus antímeros esquerdo e direito. Isso ocorre devido à disposição dos órgãos internos. O útero direito, além de ser mais cranial quando comparada com a esquerda, apresenta mais ovos no período de prenhez (JANEIRO-CINQUINI, 2004). É observado no útero de serpentes prenhes que os embriões ou fetos estão dispostos no plano dorso medial (HUBERT, 1985).

Os embriões/fetos se nutrem de massa vitelínica que é depositada na fase de vitelogênese secundária antes da ovulação. A nutrição é mantida por uma veia e uma artéria vitelínica durante toda a prenhez. A veia vitelínica principal se ramifica formando uma rede de vênulas que se inserem no sistema porta-hepático enquanto que a artéria vitelínica insere-se na aorta dorsal (RAMÍREZ-PINILLA et al., 2012).

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar e descrever a morfologia do Corpo Lúteo e da Placenta Corioalantóica em conjunto com o crescimento embrionário e fetal da serpente *Crotalus durissus*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram analisadas estruturas anatômicas e morfológicas, tanto macro como microscopicamente:

Aspectos macroscópicos

- 1- Definir a topografia e anatomia dos ovários e quantificar corpos lúteos; localizar útero e suas divisões e quantificar placentas e embriões/fetos por meio de uma incisão medial ventral com o animal eutanasiado.
- 2- Verificar se há igualdade de corpos lúteos e placentas nos antímeros direito e esquerdo.
- 3- Estimar o tempo de prenhez a partir do resultado do desenvolvimento embrionário/fetal.

Aspectos microscópicos

- 1- Observar estruturas e topografia histológica do corpo lúteo e placenta.
- 2- Identificar o estágio de desenvolvimento embrionário/fetal.

Correlação

Correlacionar os resultados obtidos macro e microscopicamente. Para tanto, foram verificadas as fases placentárias II e III, estágios de crescimento embrionário e fetal, e caracterização do corpo lúteo na correspondente época de prenhez.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AQUISIÇÃO DOS ANIMAIS

Foram analisadas dez *Crotalus durissus* fêmeas prenhes, entre os meses de outubro a janeiro, provindas do Estado de São Paulo, nos anos de 2012, 2013 e 2014. O fornecimento das fêmeas prenhes de cascavel foi realizado pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. As serpentes permaneceram em sala climatizada, com a temperatura entre 24- 27°C e umidade relativa do ar em 70%, alojadas individualmente em compartimentos próprias, onde receberam água “ad libitum” até o momento da eutanásia. No mesmo Laboratório; então, para a constatação de prenhez nessas fêmeas; antes de serem eutanasiadas, passaram por exame ultrassonográfico. O período entre o recebimento do animal e a eutanásia não excedeu 24 horas.

4.2 EUTANÁSIA

Os animais que sofreram eutanásia foram rigorosamente submetidos às Normas Bioéticas do Instituto Butantan e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As eutanásias foram realizadas no Laboratório de Coleções Zoológicas do Instituto Butantan, o qual conta com profissionais qualificados, aparelhagem e local próprio para eutanásia de répteis.

O protocolo de eutanásia usado foi seguido segundo (TAMBOURGI et al., 2010) específico para répteis. Os animais foram tranquilizados por meio de câmara hermeticamente fechada, contendo o gás dióxido de carbono (CO₂), causando depressão direta do córtex cerebral e estruturas sub-corticais.

Em seguida foi realizado o procedimento de eutanásia pesando-se a serpente para o ajuste de dose do fármaco Tiopentato de Sódio 100 mg/Kg infundida por via Intracelomática, aguardando aproximadamente 30 minutos para a evolução do óbito do animal. Como medida de segurança, foi feita avaliação da

efetividade do procedimento, verificando a ausência de batimentos cardíacos, via palpação; e auscultação por doppler vascular veterinário, modelo DV610, e ausência de movimentos respiratórios intercostais (TAMBOURGI et al., 2010).

4.3 BIOMETRIA

Todas as serpentes pós eutanasiadas foram submetidas a constatações de valores biométricos como massa, em gramas, fornecido por balança de precisão, Marte modelo Ad 2000, e Comprimento Rostro Cloacal (CRC), Comprimento Caudal (CC) e Comprimento Total (CT), que corresponde à soma das duas medidas anteriores (CRC + CC), todos auferidos em milímetros.

A biometria dos corpos lúteos foi realizada com paquímetro digital TESA, resolução 0,01 milímetros, certificado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Foi realizada a mensuração da superfície em mm² da estrutura “in natura”, logo após ter sido constatado o óbito do animal e pela necropsia.

4.4 NECRÓPSIA E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Após identificação e biometria, iniciou-se a dissecação do animal com uma incisão medial ventral na região epigástrica, a qual se estende até a cloaca. Com o animal incisado foram observados e registrados os seguintes dados: (1) estágio folicular (vitelogênica primária ou secundária); (2) número de embriões/fetos no útero; (3) quantidade e mensuração da superfície dos corpos lúteos correspondendo aos ovos fertilizados ou atrésicos.

Os corpos lúteos foram dissecados e seccionados dos ovários e acomodados em cassetes histológicos devidamente identificados. Posteriormente ficaram imersos em paraformol 4% por 3 a 5 dias para fixação das estruturas. Os úteros e placentas foram delicadamente ligados, com fio de sutura nylon 3-0, em suas porções cranial e caudal. Após a ligadura os mesmos foram seccionados, retirados da cavidade

celomática onde foi feita uma incisão mediana para a retirada do feto e excessos de vitelo e âmnio. Para acomodação e fixação do conjunto útero-placenta foi utilizada metodologia semelhante à do corpo lúteo.

Os fetos coletados foram mergulhados em Álcool 70%, seguindo o Protocolo da Coleção Herpetológica Científica do Instituto Butantan.

4.5 PREPARAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO PARA MICROSCOPIA DE LUZ DIRETA

Após o período de fixação dos corpos lúteos e placentas coletados, estes foram submetidos à desidratação, inclusão de parafina e coloração. A metodologia foi desenvolvida segundo Junqueira (1995) com modificações devido à placenta ser extremamente delgada e de difícil manipulação e ao tamanho do corpo lúteo. A técnica foi realizada no Laboratório de Anatomia Microscópica e do Desenvolvimento no Departamento de Cirurgia, setor de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.5.1 Desidratação e inclusão de parafina

- 1- Lavagem do material em água corrente durante 15 minutos. Depois transferir o material para diferentes concentrações de álcool para que ocorra sua desidratação:
- 2- Álcool 70% durante 30 minutos.
- 3- Álcool 80% durante 30 minutos.
- 4- Álcool 90% durante 30 minutos.
- 5- Álcool 1 100% durante 30 minutos.
- 6- Álcool 2 100% durante 30 minutos.
- 7- Álcool 3 100% durante 30 minutos.
- 8- Para diafanização, imergir o material em xilol 1 durante 30 minutos.
- 9- Xilol 2 durante 30 minutos.

10- Na última etapa, de impregnação, o material foi transferido para parafina 1 durante 24 horas em estufa à 56°C.

11- Parafina 2 durante 2 horas em estufa à 56°C.

4.5.2 Microtomia e preparação das lâminas

A partir dos blocos de parafina preparados, foram realizados cortes sucessivos com o Micrótomo Leica RM 2145, obtendo-se cortes histológicos de 5 µm de espessura. As fitas obtidas foram transferidas para banho-maria a 38°C. Após o distendimento da estrutura mergulhou-se a lâmina rente ao corte para sua captura. Em seguida foram transferidas para um suporte inclinado e mantidas em estufa a 60°C durante 24h para desparafinização e secagem.

4.5.3 Coloração dos Tecidos – Técnica de Hematoxilina-Eosina (HE)

- 1- Para retirada da parafina e hidratação da peça, as lâminas foram imersas em xilol 1 durante 15 minutos.
- 2- Xilol 2 durante 15 minutos.
- 3- Álcool absoluto durante 3 minutos.
- 4- Álcool 100% durante 3 minutos.
- 5- Álcool 95% durante 3 minutos.
- 6- Álcool 70% durante 3 minutos.
- 7- Lavagem das lâminas em água corrente durante 10 minutos.
- 8- Para coloração das lâminas, imergir em Hematoxilina durante 3 minutos.
- 9- Lavar em água corrente durante 10 minutos.
- 10- Mergulhar a lâmina em Álcool Ácido durante 5 segundos.
- 11- Lavar novamente em água corrente durante 30 segundos.
- 12- Desidratar em álcool 95% durante 5 segundos.
- 13- Álcool 100% durante 20 segundos.

14- Álcool 100% durante 3 minutos

15- Xilol Álcool 1:1 durante 3 minutos.

16- Xilol 1 durante 3 minutos.

17- Xilol 2 em capela para colocação da lamínula com a fixação auxiliada pela resina Permunt®. Esse processo não excedeu 15 minutos para não haver comprometimento da estrutura a ser observada.

As lâminas foram analisadas e fotografadas por microscópio de luz Coleman trinocular, com máquina fotográfica digital acoplada Sony Mavica 3,2 MP.

4.6 PREPARAÇÃO DO ÚTERO E PLACENTA PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As placentas coletadas junto ao epitélio uterino foram analisadas em MEV. Após sua identificação as placentas foram completamente incisadas na sua porção mediana e limpas retirando todo o excesso de material vitelogênico deixando apenas os epitélios uterinos e anexos extra embrionários em suas disposições naturais. Foram dispostas entre dois papéis filtro circulares e suturadas em sua borda para que não ocorresse o desvio e/ou comprometimento das suas estruturas e disposições. Por serem extremamente flexíveis, delicadas e delgadas o tempo de fixação do material foi alterado em relação à técnica clássica segundo Anderson, Blackburn e Dunlap (2011). A preparação do material foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e de Varredura no Departamento de Cirurgia, setor de Anatomia da Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Para fixação das estruturas:

1. Imergir a placenta em paraformol 4% durante 30 dias.
2. Álcool 80% durante 15 dias.
3. Álcool 90% durante 10 dias.
4. Álcool 100% durante 10 dias
5. Lavagem do material em água corrente durante 15 minutos para retirada das soluções de fixação.

Pós fixação:

O material foi imerso em tetróxido de ósmio durante duas horas. Após esse período, desidratar a seco as estruturas tissulares uterinas e os anexos embrionários em ponto crítico em aparelho Balzers CPD 020.

Foram retirados fragmentos de 3x3 centímetros e deixados horizontalmente em placa de Petri sem tampa com papel toalha em estufa de cultura biológica Fanem modelo 002CB, a 37°C por dois dias.

A montagem do material para leitura foi realizada em posição vertical, fixadas com cola de prata coloidal em um suporte metálico porta amostra para microscopia eletrônica de varredura (stub). Após a montagem, os materiais foram revestidos com ouro pelo processo de “sputtering” no aparelho metalizador EMITECH K550, formando uma camada de 20-30 nanômetros de espessura.

A leitura das amostras foi realizada no microscópio eletrônico de varredura Leo-435 VPZeiss.

4.7 LEITURA E IDENTIFICAÇÃO DOS ESTÁGIOS EMBRIONÁRIOS/FETAIS

A identificação dos embriões/fetos de *C. durissus* foi realizada comparando seus estágios com uma tabela de desenvolvimento embriológico de *Vipera aspis* segundo Hubert e Defaure (1968), na qual os autores descrevem estruturalmente a evolução embriônica e fetal desta serpente, dividindo em 43 estágios distintos. Este modelo animal é o que mais se assemelha filogeneticamente e anatomicamente com *C. durissus*.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de correlação entre as variáveis quantitativas foi realizada a partir do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson e respectivo intervalo de confiança de 95% (IC 95%). A comparação entre ovos atrésicos e fertilizados com relação à superfície do corpo lúteo (em mm²) foi realizada com o teste U de Mann-

Whitney (ZAR, 1999). O nível de significância adotado foi de 5%, e as análises foram efetuadas com o programa SPSS *for Windows* 20.0.

5 RESULTADOS

Para o presente estudo foram utilizadas dez *Crotalus durissus* fêmeas prenhas, entre os meses de outubro a janeiro, providas do Estado de São Paulo nos anos de 2012 a 2014. Os animais, após sofrerem eutanásia, foram submetidos às análises das estruturas anatômicas macro e microscopicamente.

5.1 BIOMETRIA

As constatações dos valores biométricos foram observadas através da Massa Ponderal, Comprimento Rostro Cloacal (CRC), Comprimento Caudal (CC) e Comprimento Total (CT) que corresponde à soma das duas medidas anteriores (CRC + CC) (Tabela 1; Figuras 1 e 2).

Tabela 1 - Valores biométricos das fêmeas prenhas de *Crotalus durissus*

Fêmea	Massa (g)	CRC (mm)	CC (mm)	CT (mm)
1	487	763	31	794
2	851	778	34	812
3	794	821	49	870
4	795	819	57	876
5	634	856	53	909
6	897	891	65	956
7	902	916	52	968
8	976	960	60	1020
9	995	976	51	1027
10	927	962	67	1029

Legenda: CRC= Comprimento Rostro Cloacal; CC= Comprimento Caudal; CT= Comprimento Total

Figura 1 - Mensuração do Comprimento Rostro Cloacal (CRC)

Fonte: (FEDERSONI, I.S.P.; 2012)

Figura 2 - Mensuração do Comprimento Caudal (CC)

Fonte: (FEDERSONI, I.S.P.; 2012)

Após identificação e biometria, realizou-se a dissecação do animal, onde foram observados o número de ovos; se estavam fertilizados ou atrésicos e a quantidade correspondente de corpos lúteos (Tabela 2).

Tabela 2 - Quantidade de ovos e corpos lúteos das fêmeas prenhas de *Crotalus durissus*

FÊMEA	Ovos U.d.	Ovos U.e.	Corpos lúteos O.d.	Corpos lúteos O.e.	Ovos fertilizados U.d.	Ovos fertilizados U.e.	Ovos atrésicos U.d.	Ovos atrésicos U.e.
1	5	3	5	3	2	2	3	1
	T=8		T=8		T=4		T=4	
2	9	3	9	3	9	3	0	0
	T=12		T=12		T=12		T=0	
3	6	2	6	2	6	2	0	0
	T=8		T=8		T=8		T=0	
4	9	6	9	6	9	6	0	0
	T=15		T=15		T=15		T=0	
5	8	3	8	3	8	3	0	0
	T=11		T=11		T=11		T=0	
6	6	5	6	5	6	5	0	0
	T=11		T=11		T=11		T=0	
7	7	4	7	4	7	4	0	0
	T=11		T=11		T=11		T=0	
8	9	5	9	5	9	5	0	0
	T=14		T=14		T=14		T=0	
9	10	5	10	5	9	4	1	1
	T=15		T=15		T=13		T=2	
10	11	8	11	8	9	8	2	0
	T=19		T=19		T=17		T=2	

Legenda: U.d.= Útero lado direito; U.e.= Útero lado esquerdo; O.d.= Ovário direito; O.e.= Ovário esquerdo, T= Total

As características macroscópicas dos ovos atrésicos são de fácil constatação em comparação com os ovos fertilizados. Sua consistência é maciça e resistente; seu tamanho é reduzido, geralmente com contornos amorfos; tem pouca vascularização; e pode apresentar coloração desde amarela clara até castanha escura (Figura 3).

Figura 3 - Útero de *C. durissus* contendo ovos e respectivos fetos e ovos atrésicos

Fonte: (FEDERSONI, I.S.P.; 2012)

Legenda: (→)= Ovos atrésicos

Na tabela 2 também pode ser observado que há uma relação direta entre o número de corpos lúteos e número total de ovos em cada antímero direito e esquerdo, ou seja, existe um corpo lúteo para cada ovo, independente se está fertilizado ou atrésico.

Os corpos lúteos foram visualizados e identificados na necropsia e a constatação foi realizada devido a sua forma e coloração característica como mostra a figura 4. O corpo lúteo apresenta forma oval com centro de coloração amarelada ou alaranjada, devido à picnose celular na sua formação.

Figura 4 - Aspecto macroscópico de corpos lúteos em *C. durissus*

Fonte: (FEDERSONI, I.S.P.; 2012)

Para biometria dos corpos lúteos foi realizada a mensuração da superfície em mm^2 da estrutura “in natura” logo após necropsia (Figura 5).

Figura 5 - Mensuração do comprimento do corpo lúteo

Fonte: (FEDERSONI, I.S.P.; 2012)

5.2 MICROSCOPIA DE LUZ DIRETA

Foi observado que as dez fêmeas prenhes apresentavam folículos primários em seus ovários (vitelogênese primária).

O folículo primário apresenta formato esferoide, contendo um líquido viscoso claro e translúcido no seu interior denominado de *liquor folliculi* ou líquido folicular (Figura 6). Na figura 7 nota-se o folículo primário envolto por estratos de células epiteliais provindas da camada granulosa. A membrana basal é bem definida, seu interior é vesiculado e preenchido pelo líquido folicular corado basofílicamente com distribuição uniforme.

Figura 6 - Aspecto macroscópico do folículo primário

Fonte: (FEDERSONI, I.S.P.; 2013)

Legenda: (→) = folículo primário

Figura 7 - Aspecto microscópico do folículo primário. Aumento = 40x

Fonte: (FEDERSONI, I.S.P.; 2013)

Os ovos recém ovulados tem o mesmo aspecto do folículo secundário. Estes são preenchidos por vitelo localizados nos úteros, indicando uma recente ovulação (Figura 8). A identificação do intestino é de extrema importância para se orientar quanto à localização dos úteros que se projetam paralelamente a ele.

Figura 8 - Aspecto macroscópico do folículo recém ovulado

Fonte: (FEDERSONI, I.S.P.; 2012)

Legenda: (→) = folículo secundário recém ovulado; * Porção caudal do útero; Int = intestino

Para realização das técnicas histológicas e de microscopia de luz, os corpos lúteos foram dissecados e seccionados dos ovários. Os úteros e placentas foram delicadamente ligados com fio de sutura de nylon em suas porções cranial e caudal, seccionados e retirados da cavidade.

Foram coletados no total 124 corpos lúteos e 116 placentas a partir das dez fêmeas de *C. durissus*. A diferença entre o número de corpos lúteos e de placentas foi devido à presença de oito ovos atrésicos encontrados em três fêmeas, ou seja, não possuíam placenta, pois não foram fertilizados.

A partir da coloração de hematoxilina e eosina foi possível observar duas estruturas distintas que fazem parte da morfologia do corpo lúteo. Uma região cortical do ovário, denominada de estroma ovariano, que é rica em tecido conjuntivo frouxo e apresenta hipocelularidade; e uma porção que forma o epitélio glandular envolvida por tecido conjuntivo fibroso o qual separa o corpo lúteo do estroma ovariano (Figura 9).

Figura 9 - Morfologia do corpo lúteo. (A) aumento = 40x (B) aumento = 100x

Fonte: (FEDERSONI, I.S.P., 2014)

Legenda: EO= Estroma ovariano; CL=Células luteínicas

As células luteínicas da teca ou teco-luteínicas se apresentam perifericamente às células grânulo-luteínicas constituindo uma camada mais densa e delgada (Figura 10). Esse tecido promove inúmeras e pequenas invaginações (setas) sobre o estrato de células grânulo-luteínicas, trazendo consigo diversos capilares

sanguíneos. Seu núcleo é alongado e a coloração mais escura por apresentar características mais basofílicas quando comparadas com as células grânulo-luteínicas.

O citoplasma das células “in vivo” contém micelas lipídicas e pigmento lipocrômico amarelado e/ou alaranjado, porém os métodos histológicos promovem um artefato que retira esses elementos deixando o citoplasma com aspecto vacuolizado.

Figura 10 - Células que constituem o corpo lúteo. (A) aumento = 100x (B) aumento = 400x

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2014)

Legenda: EO= Estroma ovariano; CTL= Células teco-luteínicas; CGL= Células grânulo-luteínicas; (→)= invaginação; * capilar sanguíneo

Todos os corpos lúteos foram caracterizados como funcionais ou ativos até o final da prenhez. Os corpos lúteos não apresentavam graus de involução visíveis ou formação cicatricial amorfa caracterizando corpo albicans.

O útero de *C. durissus* prenha apresenta o endométrio totalmente desenvolvido, revelando um alto grau secretor; esse estágio é chamado de estágio trans-prenhez. Seu estrato mucoso, que é constituído por células epiteliais ciliadas e não ciliadas, apresenta-se edemaciado. Em sua lâmina própria estão dispostas diversas glândulas hipertrofiadas. No estrato superior é observado o miométrio composto por tecido de muscular liso, suas fibras se dispõem em eixo longitudinal ou crânio caudal (Figura 11).

Figura 11 - Estrutura endometrial e miometrial no período pró-prenhez de *C. durissus*. Aumento = 100x

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2013)

Legenda: ML= fibras musculares constituindo a musculatura lisa do miométrio; GL = glândulas endometriais; VS = Vasos sanguíneos; (→) = células epiteliais apresentando hipertrofia do estrato mucoso

A membrana da casca do ovo é constituída por filamentos calcários. Essas estrias foram evidenciadas por meio de corte histológico de 4µm e coradas com hematoxilina e eosina (Figura 12).

Figura 12 - Visualização das estrias calcárias da membrana da casca do ovo em *C. durissus*. Aumento = 400x

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2014)

Legenda: (→) = disposição das estrias calcárias

A partir da microscopia de luz direta também foi possível observar a morfologia dos tecidos e células que compõe o útero e anexos embrionários de *C. durissus*.

Ocorre uma justaposição entre o epitélio uterino, membrana da casca do ovo e anexos embrionários, como o corioalantóide. Essa disposição de tecidos confere a formação de uma placenta corioalantóica. O aparecimento de espaços entre as estruturas denota um artefato de técnica, pois com a fixação do útero e placenta em formol 10% e, posteriormente, a desidratação do material a ser analisado pela passagem de álcoois gradualmente concentrados, ocasiona tal segregação tecidual (Figura 13).

Figura 13 - Morfologia do epitélio uterino e vilosidades placentárias. Aumento=100x

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2014)

Legenda: MC= Membrana da casca; EU= Epitélio uterino; VU= Vaso uterino; CA= Epitélio corioalantóico; VC= Vasos coriônicos

Nas disposições estruturais do útero e anexos encontram-se inúmeras vilosidades ou inter-digitações, fenômeno que ocorre conforme o embrião e/ou feto forma-se e cresce no corpo materno. Portanto foi sugerida uma classificação da placenta, a partir do aumento de vilosidades, sendo assim dividida em três estágios I, II e III.

O estágio I caracteriza-se pela justaposição da placenta e epitélio uterino em fase inicial de prenhez, onde suas superfícies apresentam pouca ou nenhuma vilosidade. Na placenta em estágio II as interfaces estruturais são mais lineares (Figura 14) se comparadas as com o estágio III, onde é visível o aumento do número de vilosidades (Figura 15). No presente estudo foram verificados os estágios placentários II e III (Tabela 3).

Figura 14 - Morfologia da placenta em estágio II. Aumento = 100x

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2014)

Figura 15 - Morfologia da placenta em estágio III. (A) aumento = 40x; (B) aumento = 100x

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2014)

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As placentas coletadas junto ao epitélio uterino foram analisadas em MEV. Elas foram completamente incisadas na sua porção mediana e retirado todo o excesso de material vitelogênico reatando apenas o epitélio uterino e anexos extra embrionários em suas disposições naturais.

A fotomicrografia de varredura apresenta topograficamente as estruturas membrana da casca e corioalantóide. Notam-se diferenças entre os dois tecidos: o corioalantóide apresenta grande número de erupções constituídas por células, e rica vascularização. Já a membrana da casca do ovo é constituída em sua maior parte por material inerte, conferindo estrutura acelular e avascular, porém rica em fenestrações (Figura 16).

Figura 16 - Estrutura e disposição da membrana da casca do ovo e alantocóion

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2013)

Legenda: Co= corioalantóide; MC= Membrana da Casca

Na figura 17 observa-se o epitélio uterino ricamente vascularizado. O corioalantóide, que foi rebatido para a face fetal, mostra impressões negativas dos vasos sanguíneos endometriais.

Figura 17 - Vascularização uterina em microscopia eletrônica de varredura

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2013)

Legenda: Co= corioalantóide; EU= Epitélio Uterino

Os vasos sanguíneos são visualizados em sua disposição natural entre a vilosidade do corioalantóide (Figura 18). Na figura 19 observa-se em maior aumento um vaso seccionado na vilosidade corioalantóica com presença de hemácias.

Figura 18 - Vascularização entre útero e corioalantóide

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2013)

Legenda: VA= Vasos sanguíneos entre a vilosidade corioalancóca; MC= Membrana da casca do ovo

Figura 19 - Vascularização corioalantóica. Vaso seccionado com presença de hemácias

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2013)

Legenda: Co= Corioalantóide; MC= Membrana da casca; He= Hemácias

5.4 LEITURA E IDENTIFICAÇÃO DOS ESTÁGIOS EMBRIONÁRIOS/FETAIS

Nos úteros e placentas foi realizada uma incisão mediana para a retirada dos fetos. A identificação do estágio correspondente foi realizada comparando-se com uma tabela de desenvolvimento embriológico de *Vipera aspis*, baseados na evolução embriônica e fetal através de suas estruturas anatômicas.

Foram coletados no total 116 fetos a partir das dez fêmeas de *C. durissus*.

Foi possível observar nas dez fêmeas que seus fetos se encontravam entre os estágios 34 a 42, ou seja, compreendiam os estágios fetais de desenvolvimento. Isso ocorreu, pois os animais cedidos para o presente estudo passavam por um exame ultrassonográfico prévio para identificação das fêmeas prenhes, e para se obter essa visualização só foi possível a partir do estágio fetal 34, ou seja, quando o feto tem, no mínimo, cinco milímetros de comprimento.

A classificação quanto ao estágio fetal de cada fêmea e respectivos estágios placentários estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Classificação dos estágios fetais e placentários das fêmeas prenhes de *Crotalus durissus*

Fêmea	Quantidade de fetos e placentas*	Estágios Fetais	Estágio Placentário
1	8	34 a 34,5	II
2	13	34,5 a 35,5	II a III
3	17	35,5 a 36	II a III
4	14	35,5 a 36	II
5	11	35,5 a 36	II a III
6	15	37,5 a 38	III
7	4	41 a 42	III
8	12	41 a 41,5	III
9	11	41,5 a 42	III
10	11	38 a 39	III

Legenda: * quantidade de fetos corresponde à quantidade de placentas

Devido às disparidades entre os fetos de *Vipera aspis* e *C. durissus*, foi feita a interseção entre os estágios dos mesmos para efetuar sua classificação. Os estágios 34 a 35,5 são muito semelhantes entre as duas espécies comparadas, havendo nuances na formação das papilas nasais e tempo de fechamento das fendas braquiais.

Nota-se que os fetos apresentam cinco espirais. As fendas branquiais permanecem presentes até o estágio 35 em *C. durissus* (Figura 20A), o que corresponde ao estágio 34 em *Vipera aspis*. Os olhos apresentam-se pigmentados, proeminentes com contorno ovalado, sendo que a diferença no formato ocular é muito sutil entre essas fases. Na boca ocorre o início de soldagem entre maxila e mandíbula; a maxila começa a se estender ultrapassando o limite dos olhos, enquanto que a mandíbula começa a se projetar além do limite da maxila, o que corresponde igualmente entre as espécies no estágio 35.

Pode-se observar a projeção de uma pequena estrutura denominada papila nasal (Figura 20B) que formará o conduto ou canal olfativo na região rostral do feto.

A cauda contém duas espirais e ainda apresenta o desenvolvimento de somitos.

Figura 20 - Fetos de *C. durissus* nos estágios 34 a 35,5

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2012)

Legenda: (□) = Região das fendas branquiais aberta; (○) = Papilas nasais

No desenvolvimento entre os estágios 36 a 38,5 os fetos apresentam olhos completamente pigmentados e as órbitas oculares mais arredondadas. O conduto olfativo apresenta-se em estágio médio de formação com formato de vírgula (Figura 21).

A região bucal se torna definida e maxila e mandíbula unidas. São observadas papilas genitais evidentes no estágio 38,5 (papila genital em maior aumento na figura 21). Essas originarão os órgãos copulatórios do macho formando os hemipênes.

Figura 21 - Feto de *C. durissus* nos estágios 36 a 38,5

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2012)

Legenda: (→) = Narina em formato de vírgula; (*) = Papila genital

Entre os estágios 40 a 42 observa-se que o contorno craniano dos fetos desenvolve formas mais alongadas, há presença de fossetas loreais completamente formadas e as narinas tornam-se visíveis e circulares perdendo o formato de vírgula. A região da boca apresenta-se completamente formada, com dentes inoculadores de peçonha desenvolvidos e envolvidos pela bainha periodontal (Figura 22).

A última vértebra caudal se torna completamente modificada. Sua arquitetura corresponde a uma área romba e proeminente da extremidade final da cauda. Nota-se a pigmentação e diferenciação das escamas que apresentam padrões de losangos e coloração característica da espécie (Figura 23).

Figura 22 - Feto de *C. durissus* nos estágios 40 a 42

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2013)

Legenda: (→) = Dente inoculador; (*) = Fosseta loreal

Figura 23 - Feto de *C. durissus* no estágio 42

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2013)

Legenda: (→) = Última vertebra caudal

5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ESTÁGIOS DE PRENHEZ

A partir da constatação do estágio de desenvolvimento embrionário e fetal inferimos o tempo de prenhez em *C. durissus*, divididos em três terços: terço inicial, médio e final. O terço inicial termina quando o feto atinge o estágio 35 de desenvolvimento onde se transforma rapidamente. Já o terço médio de prenhez se inicia no estágio 36 do feto e vai até o estágio 39, quando há o crescimento,

transformação e ajustamento das estruturas como maxila e mandíbula, desaparecimento das fendas branquiais, formação de escamas, modificação da última vertebra caudal, formação externa dos hemipênes e o mesencéfalo torna-se menos proeminente. O terço final de prenhez inicia-se no estágio fetal 40 e decorre até o estágio 43, segue apenas o crescimento do feto até a parturição e pigmentação das escamas característica da espécie.

Na figura 24 observa-se o estágio inicial de prenhez de *C. durissus* onde os ovos foram rebatidos lateralmente para evidenciar a localização dos vasos sanguíneos e dos fetos que, na disposição natural no corpo da fêmea, encontram-se na região médio dorsal. A rede vascular uteroplacentária apresenta-se em formação e é composta por grandes vasos. A irrigação é feita pelas artérias e veias uterinas dispostas em cada útero, que realizam a principal irrigação do útero anastomosando-se conforme a evolução positiva da prenhez. Paralelamente ao intestino é verificada a presença dos ovários com diversos corpos lúteos.

Figura 24 - Fêmea de *C. durissus* em estágio inicial de prenhez

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2012)

Legenda: (→) = Veias uterinas; (*) = ovários com corpos lúteos; Int = intestino

Há uma região circular que se contrasta com o vitelo amarelo claro. Nesse local encontra-se um feto em estágio 34,5 envolto pelo saco amniótico. A difícil

observação se dá pelo feto ainda não conter pigmento evidenciando a formação de escamas como observado nos estágios seguintes (Figura 25).

Figura 25 - Feto de *C. durissus* em estágio 34,5

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2012)

Legenda: Vi= Vitelo; f= feto; (→) = Saco amniótico

Na fêmea em estágio médio de prenhez (Figura 26) nota-se que o útero e a placenta se tornam congestionados devido a grande quantidade de anastomoses dos vasos sanguíneos, incluindo a artéria uterina (Figura 27). O vitelo, antes com coloração amarelo pálida, torna-se amarelo-âmbar. O feto está envolto pelo saco amniótico e nutre-se do vitelo por meio da veia e artéria umbilical (Figura 28), essas anastomosando-se em inúmeros capilares e vênulas em seu contorno.

Figura 26 - Fêmea de *C. durissus* em estágio médio de prenhez

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2012)

Figura 27 - Feto de *C. durissus* em estágio 38,5

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2012)

Legenda: f= feto; (→) = Artéria uterina

Figura 28 - Feto de *C. durissus* em estágio 36

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2012)

Legenda: SA= Saco amniótico; VU= Veia umbilical

Na fêmea em estágio final de prenhez é possível observar o feto completamente formado através da placenta e útero, com escamas diferenciadas e pigmentação características da espécie. O feto ocupa uma região de mais de 50% do ovo. O vitelo foi absorvido, e o saco amniótico ocupa sua porção (Figura 29).

Figura 29 - Fêmea de *C. durissus* em estágio final de prenhez

Fonte: (FEDERSONI, I. S. P., 2013)

5.6 CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS

Foi efetuada análise de correlação entre as variáveis quantitativas com o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson e respectivo intervalo de confiança de 95% (Tabela 4).

Tabela 4 - Correlação dos resultados obtidos macro e microscopicamente

Variáveis	Coefficiente de Pearson (r)	IC 95% para r	P
Comprimento total X no. de ovos e corpos lúteos	0,66	0,05; 0,91	0,039*
Tamanho da serpente X superfície média do CL	0,03	-0,61; 0,65	0,929
Estágio fetal X superfície do CL	0,14	-0,05; 0,31	0,140
Estágio placentário X superfície do CL	0,10	-0,09; 0,28	0,292
Estágio fetal X estágio placentário	0,75	0,66; 0,82	< 0,001*

Legenda: CL = Corpo lúteo; * Houve diferença estatística ($P < 0,05$)

Através da análise estatística, observou-se que houve diferença significativa com relação ao comprimento total da serpente e o número de ovos e corpos lúteos ($P=0,039$) (Tabela 4), sendo que quanto maior o comprimento da serpente, maior o número de corpos lúteos e ovos (Gráfico 1). Observou-se também que Independente da presença de ovos fertilizados ou atrésicos, a quantidade de corpos lúteos e ovos de cada fêmea, verificados no presente estudo, foi sempre igual.

Gráfico 1 - Correlação comprimento total da serpente X número de ovos e corpos lúteos

Pode-se observar que há uma tendência na maioria das serpentes de apresentarem corpos lúteos com 20 a 30 mm² de superfície, independente do comprimento total da serpente, no entanto, foi possível observar algumas exceções.

Na fêmea 2, que apresentava 1027 mm de comprimento, a média da superfície dos corpos lúteos foi de 10,22 mm², e na fêmea 8 com 812 mm apresentava corpos lúteos com superfícies maiores que 40 mm² (Gráfico 2). Portanto não foi possível observar uma correlação entre o comprimento total da serpente e o tamanho dos corpos lúteos ($P=0,929$) (Tabela 4).

Gráfico 2 - Correlação comprimento total da serpente X superfície do corpo lúteo

A comparação entre ovos atrésicos e fertilizados com relação à superfície do corpo lúteo foi realizada com o teste U de Mann-Whitney, adotado nível de significância de 5%. Observou-se que a mediana da superfície do corpo lúteo foi 20,02 mm² para ovos atrésicos e 24,22 mm² para fertilizados, não havendo diferença estatisticamente significativa ($P = 0,262$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Superfície do corpo lúteo (em mm²) em ovos atrésicos e fertilizados

No gráfico 4 pode-se observar que a maioria dos corpos lúteos obtidos apresentavam superfície entre 18 e 34 mm². Este tamanho foi o mais observado em todos os estágios fetais encontrados, sendo que não foi evidenciado um padrão de tamanho da superfície do corpo lúteo correspondente para cada estágio fetal. Portanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre o estágio fetal e a superfície do corpo lúteo ($P=0.140$) (Tabela 4).

Gráfico 4 - Correlação estágio fetal X superfície do corpo lúteo

Pode ser observado que o tamanho do corpo lúteo não interfere no estágio placentário ($P=0,292$) (Tabela 4), não havendo variação da superfície do mesmo entre o estágio II, onde apresenta interfaces de anexos fetais e endométrio mais lineares, quando comparadas as com o estágio III, onde há maior quantidade de vilosidades (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Correlação estágio placentário X superfície do corpo lúteo

Na correlação dos estágios fetais e placentários, observou-se diferença significativa ($P < 0,001$). Os estágios fetais 34 a 36 compreendem o estágio placentário II e a partir do 36,5 encontra-se no estágio placentário III. Há uma fase de transição no aumento das vilosidades dos anexos extra-embrionários e endométrio entre os estágios 35 e 36, portanto observa-se que há fetos nesses estágios que compreendem ambas as fases placentárias (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Correlação estágio fetal X estágio placentário

6 DISCUSSÃO

O presente estudo visou caracterizar e descrever a morfologia do corpo lúteo e da placenta corioalantóica em conjunto com o crescimento embrionário e fetal da serpente *Crotalus durissus*.

Segundo Santos et al. (2015) há uma relação entre o número de corpos lúteos e número total de ovos em cada antímero da fêmea, independente se está fertilizado ou é atrésico. No presente estudo foi observado o mesmo número de corpos lúteos e de ovos (n=124), porém não o mesmo de placentas (n=116), devido à presença de oito ovos atrésicos encontrados em três fêmeas que não possuíam placenta, pois não foram fertilizados.

Sugere-se que nas fêmeas onde foram observados ovos atrésicos haja capacidade de reabsorção dos mesmos na cavidade celomática e/ou uterina servindo para nutrir tanto a fêmea quanto os embriões e fetos no estágio trans-prenhez (SMYTH 1974; BONNET et al., 2008), e também um maior controle no tamanho e produção da ninhada segundo Alves, Jesus e Argolo (2014).

Através da análise estatística, observou-se diferença significativa com relação ao comprimento total da serpente e o número de ovos e corpos lúteos, ou seja, quanto maior o comprimento da serpente, maior o número de corpos lúteos e ovos. Resultados de Janeiro-Cinquini (2004) obtidos a partir de espécimes *Bothrops jararaca* prenhas concordam que o comprimento da fêmea tem relevância no tamanho da prole, ou seja, quanto maior o comprimento maior o número de filhotes. Já Ford e Siegel (2015) demonstram em duas espécies de serpentes vivíparas, *Thamnophis proximus* e *T. marci*, que não só o comprimento da serpente influencia na quantidade de filhotes mas também a robustez da genitora influencia no tamanho dos mesmos.

Foi também evidenciado no presente estudo que independente da presença de ovos fertilizados ou atrésicos, a quantidade de corpos lúteos e ovos de cada fêmea foi sempre igual, e que das fêmeas coletadas, nota-se que a de menor comprimento (fêmea 7 - 794 mm) já tem a capacidade de se reproduzir, porém apresentando uma quantidade menor de corpos de lúteos e ovos. Barros, Sueiro e

Almeida-Santos (2012) relataram que fêmeas de *Crotalus durissus* com 76 centímetros já conseguem se reproduzir.

Todas as fêmeas prenhes coletadas para o presente estudo apresentavam folículos primários em seus ovários. Estes são caracterizados como folículos imaturos que sofrerão posterior maturação e deposição de microelementos como íons, minerais e lipídeos, essenciais para a formação do vitelo quando a fêmea entrar em estação reprodutiva (ZACARIOTTI; GUIMARÃES, 2010). Foi observado pela técnica de hematoxilina-eosina que essa célula germinativa está envolta por estratos de células epiteliais foliculares de aspecto piriforme. Santos et al. (2015) observaram que *Tropidurus semiteaniatus* apresentam o mesmo tipo celular piriforme encontrado em *Crotalus durissus* e sugerem que estas células são responsáveis pela captação e transposição de microelementos no oócito. Afsharzadeh et al. (2015) também observaram o mesmo tipo celular em fêmeas de *Vipera albicornuta*, enquanto que Rahil e Narbaitz (1973) identificaram em *Pseudemys scripta elegans* que os folículos primários apresentam-se envoltos por essa camada celular, porém de aspecto cuboidal.

A partir da coloração de HE também foi possível observar a morfologia do corpo lúteo e do estroma ovariano. No corpo lúteo as células teco-luteínicas se apresentam perifericamente às células grânulo-luteínicas constituindo uma camada mais densa e delgada, com inúmeras e pequenas invaginações sobre o estrato de células grânulo-luteínicas e capilares sanguíneos. Seu núcleo é alongado e de coloração mais escura. O estroma ovariano é rico em tecido conjuntivo frouxo e apresenta hipocelularidade, e uma porção que forma o epitélio glandular envolvida por tecido conjuntivo fibroso, o qual separa o corpo lúteo do estroma ovariano.

Browning (1973); Licht (1979); Guillete (1997) e Rothchild (2003) observaram em diversas espécies de peixes, anfíbios, répteis e mamíferos, que no corpo lúteo há sítios de células com funções e produções de hormônios específicos. Essas contêm semelhanças e características citológicas de outras células secretoras de hormônios esteroides. São células morfologicamente globosas formando assim o epitélio glandular. O grupo de células teco-luteínicas têm a função de produzir hormônios estrogênicos, enquanto que as células luteínicas, provindas da camada granulosa, têm o papel de produzir hormônios progestágenos. Esse tipo de célula

constitui a maior parte do corpo lúteo, o qual foi verificada no presente trabalho em *Crotalus durissus*.

Todos os corpos lúteos foram caracterizados como funcionais ou ativos até o final da prenhez. Os corpos lúteos das cascavéis analisadas não apresentavam graus de involução visíveis ou formação cicatricial amorfa caracterizando corpo albicans. Segundo Veith (1974), em algumas espécies o corpo lúteo se mantém ativo até a parturição, corroborando com os resultados obtidos por Browning (1973), onde constatou em algumas espécies que possuem corpo lúteo de origem ovulatória, que o mesmo mantém atividade até o final da prenhez, regredindo um mês após a parturição. Já Ramirez-Pinilla (2014) observou no gênero *Mabouya*, a regressão do corpo lúteo que entra em luteólise no começo da gestação sugerindo que há outros tecidos que suprem o organismo de progesterona como a placenta. Acredita-se que as glândulas adrenais auxiliem na manutenção da prenhez produzindo progesterona e pregnolona. Discute-se que essas glândulas tenham evoluído junto com a viviparidade, caracterizando como uma glândula emergente extra luteal (MARTÍNEZ-TORRES et al., 2010).

Pode-se observar que a mediana de superfície dos corpos lúteos obtidos foi de 24,22 mm², no entanto, na fêmea 2, que apresentava 1027 mm de comprimento, a média da superfície dos corpos lúteos foi bem menor que o padrão obtido (10,22 mm²), e na fêmea 8 com 812 mm apresentava corpos lúteos com superfícies muito maiores (40 mm²). Com base nesse resultados não foi possível obter uma correlação entre o comprimento total da serpente e o tamanho dos corpos lúteos.

Foi observado que três serpentes apresentavam ovos atrésicos nos úteros junto aos ovos fertilizados (fêmeas 1, 9 e 10), mas na comparação entre ovos atrésicos e fertilizados com relação à superfície do corpo lúteo não houve diferença estatisticamente significativa, sendo que a mediana da superfície para ovos atrésicos foi próxima a de ovos fertilizados (20,02 mm²).

Na fêmea 1 a média da superfície dos corpos lúteos de ovos atrésicos e fertilizados foi de 20,738 mm² e 21,092 mm², respectivamente, não apresentando uma diferença significativa no tamanho. Isso provavelmente se deve ao fato da fêmea ser jovem, e possivelmente primípara, inferindo-se pelo seu comprimento total reduzido (794 mm) e presença de oito ovos, sendo 50% fertilizados e 50% atrésicos. Foi possível observar também ausência de corpo albicans nos ovários constatando que anteriormente não houve ovulação e/ou prenhez.

Entretanto, a fêmea 9 apresentou uma média da superfície dos corpos lúteos atresícos de 6,949 mm², enquanto que os ovos embrionados apresentaram média de 10,220 mm². Na fêmea 10, as médias da superfície dos corpos lúteos de ovos atresícos e embrionados foi de 27,104 mm² e 42,465 mm², respectivamente. Portanto, foi possível observar que nestas fêmeas a medida da superfície dos corpos lúteos correspondentes aos ovos atresícos se apresentava muito menor do que a dos ovos fertilizados.

O estágio pró-prenhez verificado no presente estudo foi reconhecido pelo endométrio totalmente desenvolvido, revelando um alto grau secretor. Foi observado que a região peri-luminal uterina é composta por epitélio colunar simples, assim como Girling (2002) descreve o mesmo tipo tecidual em Squamatas vivíparas; e logo acima estão dispostas diversas glândulas, cuja principal função seja produção e transporte de albumen aos folículos, e íons para a formação da casca do ovo. Os autores Almeida-Santos e Orsi (2002) e Parker, Murphy e Thompson (2010) também observaram que o útero reptiliano possui em sua lâmina própria diversas glândulas hipertrofiadas que são essenciais para o auxílio da implantação e manutenção do embrião e/ou feto durante toda a prenhez, bem como a formação da membrana da casca do ovo. Ao redor das glândulas estão dispostos inúmeros vasos sanguíneos que transportam essas substâncias provindas das mesmas para a placenta visando o aporte e transporte gasoso e nutricional materno-fetal, como verificado por Bichard (1984); Yaron (1985); Blackburn (1993) e Almeida-Santos e Orsi (2002). Parker, Murphy e Thompson (2010), por colorações histológicas específicas dos vasos uterinos, verificaram que a densidade vascular do útero de fêmeas prenhes é maior em espécies vivíparas, como relatado no lagarto *Sceloporus bicanthalis*.

Observou-se entre o epitélio uterino e corioalantóide uma estrutura continua e delgada extremamente corada denominada membrana da casca do ovo, constituída por filamentos calcários. No presente estudo, foi possível visualizar pela primeira vez, através da coloração de hematoxilina e eosina, a disposição estrutural dos filamentos calcários em forma de trama, sugerindo o favorecimento de uma maior área de influência para a sustentação da placenta, interferindo diretamente na troca gasosa devido à sua porosidade. Segundo Blackburn (1993), o adelgaçamento ou até o desaparecimento da membrana da casca em algumas espécies, confere caráter evolutivo de viviparidade.

Posterior à membrana da casca do ovo foi também visualizado a membrana corioalantóica, com presença de grande quantidade de vasos sanguíneos semelhantes ao epitélio uterino. O embrião localizava-se na região celomática dorso medial no corpo da fêmea prenhe onde o mesmo ficava envolvido e justaposto aos vasos sanguíneos.

No presente estudo, foi inferida uma classificação da placenta em três estágios I, II e III, sendo que foram verificados apenas os estágios placentários II e III. O estágio I não foi conferido devido a todos os organismos coletados serem fetos e não embriões. A classificação foi efetuada de acordo com a morfologia das vilosidades apresentadas entre placenta e útero. Sugere-se nesse trabalho que o aumento das vilosidades uteroplacentárias que são promovidas ao longo da prenhez tenha como principal objetivo ampliar a área de contato minimizando o aumento de volume e aumentando o poder de absorção materno-fetal, conferindo aporte e transporte gasoso e nutricional maior para o feto, além de manter a placenta fixada ao útero.

Segundo Guyton (1976) e Martin, Timmons e Tallitsch (2009), conforme o organismo cresce suas necessidades fisiológicas aumentam. O crescimento de área promovida pelas vilosidades, circunvoluções e sulcos são observadas em diversos tecidos como o córtex cerebral e intestino. Parker, Murphy e Thompson (2010) também observaram o mesmo evento em duas espécies de lagartos ovíparos, *Ctenotus taeniolatus* e *Saiphos equalis*, onde retêm os ovos até estágios embrionários mais avançados, apresentado uma placenta simples. Esses autores relatam que houve um aumento exponencial da densidade vascular e tortuosidade dos vasos uterinos conforme os embriões cresciam no útero das genitoras.

A identificação dos estágios correspondentes dos fetos de *C. durissus* coletados foi realizada comparando-se com estruturas de *Vipera aspis* segundo Hubert e Defaure (1968), baseando-se na evolução embriônica e fetal composta por 43 estágios distintos.

Todos os fetos coletados encontravam-se entre os estágios 34 a 42, ou seja, compreendiam os estágios fetais de desenvolvimento. Algumas disparidades foram notadas entre as espécies distintas, porém o modelo animal usado no artigo é o que mais se assemelha filogeneticamente, anatomicamente e morfologicamente com o do estudo até o presente momento.

A partir da constatação do estágio de desenvolvimento embrionário e fetal pode-se inferir o tempo de prenhez em *C. durissus*, divididos em três terços: inicial, médio e final, sendo que no presente estudo, foram observados os tempos médio e final de prenhez. Essa classificação foi formulada para que haja uma nomenclatura obstétrica instituída no estágio trans-prenhez em repteis vivíparos. Tal nomenclatura é de uso corrente na medicina veterinária para outras Classes de animais, sendo um atributo imprescindível aos estudos obstétricos futuros.

O tamanho da superfície dos corpos lúteos mais observado nos estágios fetais identificados foi entre 18 e 34 mm², o que pode-se sugerir ser o tamanho padrão para uma prenhez normal.

Porém, as duas fêmeas maiores do presente estudo apresentaram superfícies de corpos lúteos com valores distantes, mantendo uma prenhez nos mesmos estágios fetais. Na fêmea 9, que apresentava 1027 mm de comprimento e média da superfície dos corpos lúteos de 10,22 mm², os fetos se concentraram apenas entre os estágios 34,5 e 35. Apesar de ser uma fêmea grande, compreendia corpos lúteos abaixo da média observada em outras fêmeas com estágios próximos. Já a fêmea 10 com 1029 mm de comprimento e corpos lúteos com superfície média de 42,43 mm², os fetos concentraram-se entre os estágios 35,5 e 36. Portanto, não foi observada diferença estatística entre o estágio fetal e a superfície do corpo lúteo.

Pode ser constatado também que o tamanho do corpo lúteo não interfere no estágio placentário, não havendo variação da superfície do mesmo entre os estágios II e III observados no presente estudo.

Já na correlação dos estágios fetais e placentários, observou-se diferença estatística significativa, sendo que os estágios fetais 34 a 36 compreendem o estágio placentário II e a partir do 36,5 encontra-se no estágio placentário III. Vale ressaltar que há uma fase de transição no aumento das vilosidades dos anexos extra-embrionários e endométrio entre os estágios 35 e 36, onde presenciou-se fetos nesses estágios em ambas as fases placentárias.

7 CONCLUSÕES

Foram analisadas estruturas anatômicas e morfológicas da serpente *Crotalus durissus*, onde foi observado que possui o corpo lúteo de caráter ovulatório e a placenta do tipo corioalantóica evolvida por uma delgada membrana da casca do ovo.

Pode-se concluir que há uma relação direta entre o número de corpos lúteos e número total de ovos em cada antímero direito e esquerdo, existindo um corpo lúteo para cada ovo, independente se está fertilizado ou atrésico. Porém, há diferença entre o número de corpos lúteos e de placentas, sendo que os ovos atrésicos não possuem placenta, pois não foram fertilizados, apesar de apresentarem corpo lúteo.

Concluiu-se também que o tamanho padrão da superfície dos corpos lúteos para uma prenhez normal é de 18 a 34 mm², bem como foi inferida uma classificação da placenta em três estágios I, II e III, efetuada de acordo com a morfologia e aumento das vilosidades apresentadas entre placenta e útero.

Pela primeira vez foi possível visualizar, através da coloração de HE, a disposição estrutural dos filamentos calcários em forma de trama, sugerindo o favorecimento de uma maior área de influência para a sustentação da placenta, interferindo diretamente na troca gasosa devido à sua porosidade.

A partir da identificação do estágio de desenvolvimento embrionário e fetal pode-se inferir o tempo de prenhez em *C. durissus*, classificadas em três terços, inicial, médio e final, sendo assim formulada uma nomina obstétrica no estágio trans-prenhez em reptéis vivíparos.

REFERÊNCIAS

AFSHARZADEH, N.; SHIRAV, A.; TODEHDEHGHAN. Seasonal Changes in Ovarian Follicle Growth in Iran Viper (*Vipera albicornuta*). *Advances in Biology*, v. 2015, 2015. Doi 0.1155/2015/953045. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ab/2015/953045/>>. Acesso em: 05 jan.2016

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; LAPORTA-FERREIA, I. L.; PUORTO, G. ritual de combate em *Crotalus durissus*. **Anais da academia brasileira de ciências**, v. 52, p. 418, 1990.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ORSI, A. M. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus 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 rattlesnakes *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae, Crotalinae), **Japanese Journal Herpetology**, v. 17, p. 46-52, 1997.

ALVES, F. Q.; JESUS, J. A.; ARGOLO, A. J. S.; Postura de ovos não fertilizados por *Bothrops leucurus* e *Bothrops neuwiedi* em cativeiro (Serpentes, Viperidae), **Revista Biotemas**, v. 27, n. 2, p. 213-216, 2014.

ANDERSON, K. E.; BLACKBURN, D. G.; DUNLAP, K. D. Scanning electron microscopy of the placental interface in the viviparous lizard *Sceloporus jarrovi* (Squamata: Phrynosomatidae), **Journal of morphology**, v. 272, n. 4, p. 465-484, 2011.

ANDREWS, R. M.; MATHIES, T. Natural history of reptilian development: Constraints on the evolution of viviparity. **Biocience**. v. 50, n. 3 p. 227-238, 2000.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidente crotálico. In: SCHVARTSMAN, S. **Plantas venenosas e Animais peçonhentos**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1992. p. 161-167.

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

phylogenetic conservatism of reproductive patterns. **Herpetological Journal**, v. 22, n. 1, p. 97-104, 2012.

BASTOS, E. G. de M.; ARAUJO, A. F. B.; SILVA, H. R. da. Records of the rattlesnakes *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti) (Serpentes, Viperidae) in the State of Rio de Janeiro, Brazil: a possible case of invasion facilitated by deforestation. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 812-815, 2005.

BLACKBURN, D. G. Chorioallantoic placentation in squamata reptiles; structure, function, development, and evolution. **The journal of Experimental Zoology**, v. 266, n. 1, p. 414- 430, 1993.

BERISHA, B.; SCHAMS D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.; EINSPANIER, R. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v.63, n. 4, p.1106-1114, 2000.

BOUGHNER, J. C.; BUCHTOVÁ, M.; FU, K.; DIEWERT, V.; HALLGRÍMSSON, B.; RICHMAN, J. M. Embryonic development of *Python sebae* – I: Staging criteria and macroscopic skeletal morphogenesis of the head and limbs. **Zoology**, v. 110, v. 3, p. 212-214, 2007.

BONNET, X.; NAULLEAU, G.; BRADSHAW, D.; SHINE, R. Changes in plasma progesterone in relation to vitellogenesis and gestation in the viviparous snake: *Vipera aspis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 121, n. 1, p. 84-94, 2001.

BONNET, X.; AKOKA, S.; SHINE, R.; POURCELOT, R. Disappearance of eggs during gestation in a viviparous snake (*Vipera aspis*) detected using non-invasive techniques. **ACTA Herpetologica**, v. 3, n. 2, p. 134-135, 2008.

BROWNING, H. C. The evolutionary history of the corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 8, n. 1, p. 128-157, 1973.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin América**. New York: Comstock, 1989. 330 p.

CARROL, R. L.; ANDREWS, S.; MILES, R.; WALKER, A. **The origin of lizards**. London: Academic Press Inc, 1977. p. 359-96.

DAMBER J. E.; CAJANDER, S.; GAVELS, M.; SELSTAM, G. Blood flow changes and vascular appearance in pre ovulatory follicles and corpora lutea in immature pregnant mare's serum gonadotropin-treated rats. **Biology of Reproduction**, v. 37, n. 3, p. 651-658, 1987.

DESSAUER, H. C.; FOX, W. Changes in ovarian follicle composition with plasma levels of snakes during estrus. **American Journal Physiology**, v. 197, p 360-366, 1959.

DILLER, L. V; WALLACE, R. L. Reproductive biology of the Northern Pacific rattlesnakes (*Crotalus viridis oreganus*) in Northern Idaho. **Herpetologica**, v. 40, n. 2, p. 182-193, 1984.

DILLER, L. V.; WALLACE, R. L. Growth, reproduction, and survival in a population of *Crotalus viridis oreganus* in north Central Idaho. **Herpetological Monographs**, v. 6, n1, p. 26-45, 2002.

FORD, N. B.; SIEGEL, N .A. The influence of female body size and shape on the trade-off between offspring number and offspring size in two viviparous snakes. **Journal of Zoology**, v. 295, n. 2, p. 154-158, 2015

GIOMETTI, I. C.; CASTILHO, A. C. S.; SÁ FILHO, A. C.; PAPA, P. C.; BURATINI Jr, J. Controle local e endócrino do desenvolvimento e regressão do corpo lúteo bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal-Belo Horizonte**, v. 33, n 1, p. 34-52, 2009.

GIRLING, J. E. The reptilian oviduct: A review of structure and function and directions for future research. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, n. 2, p. 141-170, 2002.

GUARINO, F. M.; PAULESU, L.; CARDONE, A.; BELLINE, L.; GHIARA, G.; ANGELINI, F. Endocrine activity of the corpus luteum and placenta during pregnancy in *Chalcides chalcides* (Reptilia, Squamata). **General and Comparative Endocrinology**, v. 111, n. 1, p. 261-270, 1998.

GUILLETTE, L. J.; CREE, A. Morphological changes in the corpus luteum of Tuatara, (*Sphenodon punctatus*) during gravidity, **Journal of Morphology**, v. 232, n. 1, p. 79-91, 1997.

GURAYA, S. S. A Histochemical Study of Follicular Atresia in the Snake Ovary, **Journal of Morphology**, v. 117, n. 2, p. 151-159, 1965.

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1976. 780 p.

HANSEL, W.; DOWD, J. P. Hammond Memorial Lecture. New concepts in the control of corpus luteum function. **Journal Reproduction and Fertility**, v.78, n. 1. p.755-768, 1986.

HSIANG, A.L.; FIELD, D. J.; WEBSTER, T. H.; BEHLKE, A. D. B.; DAVIS, M. B.; RACICOT, R. A.; GAUTHIER, J. A. The origin of snakes: revealing the ecology, behavior, and evolutionary history of early snakes using genomics, phenomics, and the fossil record, **BMC Evolutionary Biology**, v. 15, n. 87, p. 2, 2015.

HUBERT, J. Embriology of the Squamata. In: GANS, C.; BILLET, F. **Biology of the reptilia**. New York: B.Wiley, 1985. p. 1-34.

HUBERT, J.; DUFAURE. Table de développement de la vipère aspic: *Vipera aspis*. **Le Bulletin de la Société Zoologique de France**, v. 93, n. 1, p.135–148 1968.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F. Capacidade reprodutiva de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae), **Iheringia Serie Zoologia**, v. 94, n. 4, p. 429-431, 2004.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F. Variação anual do sistema reprodutor fêmeas de *Bothrops jararaca* (Serpentes; Viperidae), **Iheringia Serie Zoologia**, v. 94, n. 3, p. 325-328, 2004.

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

LICHT, P. Reproductive endocrinology of reptiles and amphibians: Gonadotropins. **Annual Review of Physiology**, v. 41, p. 337-351, 1979.

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

MARTIN, H. S.; TIMMONS, M. J.; TALLITSCH, R. B. **Anatomia humana**. 6. ed. Rio Grande do Sul: Artmed, 2009. 396 p.

MARTÍNEZ-TORRES, M.; HERNÁNDES-CABALLERO, M. E.; LUIS-DIAS, M. A.; ORTIZ-LÓPEZ, G.; CÁRDENAS-LÉON, M.; MORENO-FIERROS, L. Effects of luteectomy in early pregnancy on the maintenance of gestation and plasmaprogestosterone concentrations in the viviparous temperate lizard *Barisia imbricata imbricata*. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 8, n. 19, p. 6-7, 2010.

PARKER, S. L.; MURPHY, C. R.; THOMPSON, M. B. Uterine angiogenesis in squamate reptiles: implications for the evolution of viviparity. **Herpetological Conservation and Biology**, v. 5, n. 2, p. 330-334, 2010.

PIZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS S. M.; MARQUEZ, O. A. V.; Oliveira, M. E.; BARRETO, L. Biologia reprodutiva de serpentes brasileiras. **Herpetologia no Brasil**, v. 2, n. 2, p. 201-221, 2006.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B.; **A Vida dos vertebrados**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 327 p.

RAHIL, F. S.; NARBAITZ, R.; Ultrastructural studies on the relationship between follicular cells and growing oocytes in turtle *Psudemys scripta elegans*. **Journal of Anatomy**, v. 115 , n. 2, p. 175-176, 1973.

RAMÍREZ-PINILLA, M. P.; Biología reproductiva y placentotrofía en lagartijas del género *Mabuya*. **Revista académica colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales**, v. 38, p. 111, 2014.

RAMÍREZ-PINILLA, M. P.; PARKER, S. L.; MURPHY, C. R.; THOMPSON, M. B.; Uterine and chorioallantoic angiogenesis and changes in the uterine epithelium during gestation in the viviparous lizard, *Niveoscincus conventryi* (Squamata: Scincidae). **Journal of Morphology**, v. 273, n. 1, p. 8-23, 2012.

ROTHCHILD, I. The Yolkless Egg and the Evolution of Eutherian Viviparity. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 2, p. 337-357, 2003.

SANTOS, H. S.; SANTOS, J. M. S.; MATOS, M. H. T.; SILVA, N. B.; FREIRE, E. M. X.; RIBEIRO, L. B. Ovarian follicular cycle of *Tropidurus hispidus* and *Tropidurus semitaeniatus* (Squamata: Tropiduridae) in a semiarid region of Brazil. **Zoologia**. v. 32, n. 1, p. 88-91, 2015.

SHINE, R. A. new hypothesis for the evolution of viviparity in reptiles. **The American Naturalist**, v. 145, n. 5, p. 809-823, 1995.

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

SMYTH, M.; Changes in the fat store of the skinks, *Morethia boulengeri* and *Heriergis peronii* (Lacertilia). **Australian Journal Zoology**, v. 22, n. 2, p. 135-145, 1974.

SOERENSEN, B. **Animais peçonhentos**: reconhecimento, distribuição geográfica, produção de soros, clínica e tratamento dos envenenados. Rio de Janeiro: Atheneu, 1990. 138 p.

TAMBOURGI, D. V.; BIZERRA, A. S.; QUEIROZ, G. P.; IBAÑES, O. C. M.; SANTORO, M. L. **Manual prático sobre usos e cuidados éticos de animais de laboratório**. São Paulo: Instituto Butantan, 2010 . 104 p.

TINKLE, W. D.; GIBBONS, J. W. The distribution and evolution of viviparity in reptiles. **Museum of Zoology of the University of Michigan**, v. 154, n. 1, p. 1-55, 1977.

UETZ, P. How many species? In: UETZ, P.; HALLERMAN, J. **TIGR reptile database**. 2014. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>>. Acesso em: 21 jan. 2014.

VEITH, W. J.; Reproductive biology of *Chamaeleo pumilus pumilus* with special reference to the role of the corpus luteum and progesterone. **Zoologica Africana**, v. 9, n. 2, p. 166-167, 1974.

WAREHAM, D. C. **Elsevier's dictionary of herpetological and related terminology**. Netherlands: Elsevier Saunders, 2005. 129 p.

WISE, P. A. D.; MATTHEW K. V.; RUSSEL, A. P. An Embryonic staging table for in ovo development of *Eublepharis macularius*, the Leopard Gecko. **The Anatomical Record**, v. 292, n. 1, p. 1198-1212, 2009.

YARON, Z. Reptilian placentation and gestation: structure, function and endocrine control. In: GANS, C.; BILLET, F. (Ed.). **Biology of the reptilia**. New York: John Wiley and Sons. 1985. v. 15. p. 530- 536,

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

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 663 p.

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

ANEXO

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO

23/06/2016

Gmail - [CAB] Agradecimento pela submissão

Igor Federsoni <ifedersoni@gmail.com>

[CAB] Agradecimento pela submissão

Antônio José Siqueira Borges <revistacab@gmail.com>

23 de junho de 2016 10:11

Para: Doutor Igor Stefan Popovic Federsoni <ifedersoni@gmail.com>

Doutor Igor Stefan Popovic Federsoni,

Agradecemos a submissão do trabalho "CARACTERIZAÇÃO E DESCRIÇÃO MORFOLÓGICAS DO CORPO LÚTEO DE CROTALUS DURISSUS PRENHES." para a revista Ciência Animal Brasileira.

Acompanhe o progresso da sua submissão por meio da interface de administração do sistema, disponível em:

URL da submissão: <https://revistas.ufg.br/vet/author/submission/41996>

Login: igorfedersoni

Em caso de dúvidas, entre em contato via e-mail.

Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de compartilhar seu trabalho.

Antônio José Siqueira Borges
Ciência Animal Brasileira

Ciência Animal Brasileira <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet>