KARINA MARIA PEREIRA DA SILVA

**Biologia reprodutiva da jararaca da Amazônia, *Bothrops atrox* (Serpente:
Viperidae)**

São Paulo

2015

KARINA MARIA PEREIRA DA SILVA

**Biologia reprodutiva da jararaca da Amazônia, *Bothrops atrox* (Serpente:
Viperidae)**

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

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dra. Selma Maria de Almeida Santos

São Paulo
2015

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3078
FMVZ

Silva, Karina Maria Pereira da
Biologia reprodutiva da jararaca da Amazônia, *Bothrops atrox* (Serpente:
Viperidae) / Karina Maria Pereira da Silva. -- 2015.
81 f. : il.

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

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

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

1. Jararaca da Amazônia. 2. Ciclo reprodutivo. 3. Espermiogênese. 4.
Estocagem de espermatozoides. 5. Segmento sexual renal. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Biologia reprodutiva de *Bothrops atrox* (Serpente: Viperidae) - Uma análise comparativa das populações da Amazônia oriental e ocidental", protocolado sob o nº 2713/2012, utilizando exemplares de serpentes, machos e fêmeas, provenientes de diversas coleções biológicas, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Selma Maria Almeida Santos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/8/2012.

We certify that the Research "Reproductive biology of *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae) - A comparative analysis of the populations of eastern and western Amazon", protocol number 2713/2012, under the responsibility Profa. Dra. Selma Maria Almeida Santos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/15/2012.

São Paulo, 26 de março de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Karina Maria Pereira da

Título: Biologia reprodutiva da jararaca da Amazônia, *Bothrops atrox* (Serpente: Viperidae)

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituicao: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituicao: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituicao: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai, Airton Pereira da Silva (in memoria), por sempre acreditar em mim e me apoiar em todos os momentos e por fazer o possível para a realização do sonho de herpetóloga ainda na iniciação. Pai Obrigada!!!

Ao Demian, que me acompanha ao longo de quatro anos. Obrigada por todo carinho, cuidado, paciência e amor. Por apoiar e acreditar na realização deste projeto. AMO VOCÊ.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Selma M. de Almeida-Santos. Obrigada Selma por me acolher ainda na iniciação, sou muito grata a você por ter me ajudado a realizar esse sonho e por acreditar em mim, pelo apoio e incentivo em todos os momentos. E também pelo exemplo de carinho e preocupação com todos nós do grupo de reprodução.

Ao Otavio A. V. Marques pela parceria e apoio, sem sua ajuda a viagem ao Pará seria muito difícil. Obrigada Otávio!!!

Ao Ricardo J. Sawaya, pela sua atenção e acolhimento quando ainda eu apenas buscava informações e bibliografias para o meu trabalho de reprodução em cativeiro com serpentes. Obrigada Ricardo por apresentar a Selma, a partir desse momento a minha vida mudou.

À Leticia Ruiz Sueiro por me ensinar a dissecar e coletar dados da biologia reprodutiva de serpentes e pelos seus brilhantes conselhos.

À Karina Kasperoviczus pelas valiosas sugestões e ajuda com a classificação dos estágios testiculares e gráficos.

Ao Henrique Braz pelas valiosas sugestões e pela enorme paciência e atenção ao me ensinar estatística. Obrigada casal!!

Ao Valdir Germano e Hebert Ferrarezzi pelas preciosas sugestões taxonômicas do grupo atrox.

Ao Moisés Barbosa de Souza pela sua atenção e gentileza ao disponibilizar dados de nascimento de *B. atrox*

Ao Rafael de Fraga por disponibilizar dados valiosíssimos de fêmeas prenhes de *B. atrox*.

À Maria Ermelinda E. S. Oliveira por ter conseguido artigos muito importantes que complementaram a minha dissertação e pelos contatos de curadores.

Aos curadores das seguintes coleções: Moisés Barbosa de Souza; Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Acre. Hipócrates Chalkidis; Laboratório de Pesquisas Zoológicas das Faculdades Integradas do Tapajós, Pará. Richard Vogt; Coleção Herpetológica de Anfíbios e Répteis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia Mariluce Rezende Messias; Coleção de Referência da Herpetofauna de Rondônia. Paulo Manzani; Coleção de Répteis do Museu de Zoologia da Unicamp. Felipe Franco Cursio; Coleção de Vertebrados, Mato Grosso. Paula Passos e Ronaldo Fernandes; Coleção de répteis

do Museu Nacional do Rio de Janeiro. Gláucia Ponte; Coleção do Museu de Ciência e Tecnologia da PUC. Hussan Zaher; Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

Ao Hipócrates Chalkidis que me acolheu em Santarém e pela sua parceria e enorme atenção e gentileza, e ainda por disponibilizar os espécimes de *B. atrox* de sua tese de doutorado e a linda foto na capa.

Ao Pedro Salomão. Muito obrigada pela amizade!!! E ajuda com a coleta de dados.

À Isla Marialva por disponibilizar dados importantíssimos de nascimentos e pela ajuda na coleta. Obrigada LPZ.

À Maria José por gentilmente ter liberado o uso do microscópio para eu fotografar as lâminas. E a Karina Banci e Camilla Bruno Di Nizo pelo auxílio no uso dos equipamentos.

Ao Igor Stefan pela confecção e auxílio com a amostra do Corpo albicans. Material importantíssimo!!

À Verônica Alberto Barros por disponibilizar dados e material histológico de *B. atrox*.

À Lívia Carla Chagas por disponibilizar espécimes de *B. atrox*. Material muito importante!

Ao Claudio Rojas e Diego Muniz-da-Silva por me apresentarem o laboratório de histologia do departamento de anatomia da USP. E por me auxiliarem na confecção das minhas primeiras lâminas histológicas.

Ao Ronaldo e demais funcionários do laboratório de histologia do departamento de anatomia da USP, por todo auxílio prestado.

Ao Claudio Rojas pelas sugestões e ajuda na coleta dos dados histológicos e leitura das lâminas de segmento sexual renal e receptáculos de estocagem de espermatozoides.

Ao Marcelo Duarte por ter conseguido artigos muito importantes sobre dimorfismo sexual.

Ao Guilherme Guidolin Galassi por preciosas informações de acasalamento e nascimento de filhotes em cativeiro de *B. atrox*.

À minha família, em especial a minha mãe Maria da Soledade, irmãos Valéria Cristina e Rogério e tia Maria Madalena. Obrigada pelo apoio e por acreditarem em mim.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan, Lívia Cristina dos Santos, Fernanda Magno Amaral, Ingrid Stein, Erick Augusto Bassi e em especial Kalena Barros pelas preciosas sugestões e Rafaela Zani Coeti pela ajuda na confecção de algumas lâminas. Obrigada pessoal pelo apoio e incentivo. Adoro Vocês!!

À todos os alunos e funcionários do Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan. Em especial D. Maria, Adriano, Kelly, Cristiane, Darina e Regina, obrigada pelo apoio e ajuda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

SILVA, K. M. P. **Biologia reprodutiva da jararaca da Amazônia, *Bothrops atrox* (Serpente: Viperidae).** [Reproductive biology of the Amazonian lancehead, *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae)]. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Bothrops atrox é uma serpente de grande importância ecológica devido a sua ampla distribuição geográfica no vasto e diversificado habitat amazônico. Informações sobre a biologia reprodutiva de *B. atrox* são escassas e pontuais, sendo a maioria dos dados provenientes de serpentes mantidas em cativeiro. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo descrever o ciclo reprodutivo de *B. atrox*, bem como as estratégias reprodutivas relacionadas a este ciclo tais como: maturidade e dimorfismo sexual, fecundidade, estocagem de espermatozoides e hipertrofia do segmento sexual renal nos machos. Além disso, o trabalho visou ainda relacionar tais estratégias com as condições ambientais (temperatura e precipitação). Para tanto, foram examinados 325 espécimes de *B. atrox*, sendo machos e fêmeas (maduros e imaturos), provenientes da Amazônia brasileira, preservados em nove coleções herpetológicas. Resultados mostraram haver diferenças relacionadas ao dimorfismo sexual: filhotes machos exibiram a coloração da ponta da cauda amarela, enquanto fêmeas apresentaram a ponta da cauda com coloração escura. Foi também observado que filhotes machos possuíam pigmentação escura na região gular e fêmeas apresentaram coloração clara. As fêmeas adultas foram significativamente maiores que os machos e atingiram a maturidade sexual com maiores tamanhos corpóreos. A vitelogênese foi sazonal (janeiro a agosto), entretanto, não houve sincronia entre a ocorrência de fêmeas prenhes e o período de nascimento dos filhotes. Assim, a extensão observada no ciclo reprodutivo das fêmeas foi possível devido à estocagem de espermatozoides, já que a cópula é sazonal. O ciclo reprodutivo dos machos foi descontínuo, sazonal semi-sincrônico. A produção de espermatozoides ocorreu ao longo do ano, no entanto, a espermiogênese foi observada principalmente no início da estação chuvosa (IEC) e a regressão testicular no início da estação seca (IES). Estocagem de espermatozoides nos ductos deferentes foi observada durante todos os meses do ano e o segmento sexual renal apresentou hipertrofia no IEC e final da estação chuvosa (FEC), sincronizado, portanto com a espermiogênese. Dessa forma, as condições ambientais (temperatura e pluviosidade) foram fundamentais na determinação do tipo de ciclo reprodutivo em *B. atrox*. Fêmeas prenhes foram encontradas durante vários meses do ano e o pico da atividade testicular ocorreu na estação chuvosa.

Palavras-chave: Jararaca da Amazônia. Ciclo reprodutivo. Espermiogênese. Estocagem de espermatozoides. Segmento sexual renal.

ABSTRACT

SILVA, K. M. P. **Reproductive biology of the Amazonian lancehead, *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae).** [Biologia reprodutiva da jararaca da Amazônia, *Bothrops atrox* (Serpente: Viperidae)]. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Bothrops atrox is a snake of large ecological importance due to its wide geographic distribution in the vast and diversified Amazonian habitat. Information about the reproductive biology of *B. atrox* are scarce and punctual, with most information derived from snakes kept in captivity. Thus, this paper aimed to describe the reproductive cycle of *B. atrox*, as well as reproductive strategies related to this cycle as: maturity and sexual dimorphism, fecundity, sperm storage, and the hypertrophy of sexual segment of the kidney in males. Moreover, this work also aimed to relate such strategies with environmental conditions (temperature and precipitation). For that, it were examined 325 specimens of *B. atrox*, being males and females (mature and immature) from the Brazilian Amazon, preserved in nine herpetological collections. Results showed some differences related to sexual dimorphism: neonates males had the coloration of the tail tip yellow, whereas females showed the tail tip with dark coloration. It was also observed that neonate males had dark pigmentation in the throat region, whereas neonate females showed lighter coloration. Adult females were significantly larger than males, and attained sexual maturity at larger body sizes than males. Vitellogenesis was seasonal (January to August), however, there was no synchrony between the occurrence of pregnant females and birth periods. Thus, the extent observed in the female reproductive cycle was possible due to the sperm storage, since mating is seasonal. Male reproductive cycle was discontinuous, seasonal semi-synchronous. Sperm production occurred throughout the year, however, spermiogenesis was observed mainly in the beginning of the rainy season (BRS) and testicular regression in the beginning of the dry season (BRS). Sperm storage in the ductus deferens was observed during all months of the year and the sexual segment of the kidney presented hypertrophy in BRS and in the end of the rainy season (ERS), thus synchronized with spermiogenesis. Therefore, environmental conditions (temperature and rainfall) were essential in determining the type of reproductive cycle of *B. atrox*. Pregnant females were found during several months of the year and the peak of testicular activity occurred in rainy season.

Keywords: Amazonian lancehead. Reproductive cycle. Spermiogenesis. Sperm storage.
Sexual segment of the kidney.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 BIOLOGIA REPRODUTIVA DE MACHOS E FÊMEAS DA JARARACA DA AMAZÔNIA, <i>BOTHROPS ATROX</i>: UMA ABORDAGEM MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA	17
2.1 INTRODUÇÃO.....	17
2.2 MATERIAL E MÉTODO	20
2.3 RESULTADOS	26
2.3.1 Dimorfismo e maturidade sexual.....	26
2.3.2 Biologia reprodutiva das fêmeas	27
2.3.3 Biologia reprodutiva dos machos	31
2.4 DISCUSSÃO	35
2.5 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42
APÊNDICE	48
ANEXO.....	50
3 ESTRATÉGIAS DE ESTOCAGEM DE ESPERMATOZOIDES EM FÊMEAS DA JARARACA DA AMAZÔNIA, <i>BOTHROPS ATROX</i>.....	64
3.1 INTRODUÇÃO.....	64
3.2 MATERIAL E MÉTODO	66
3.3 RESULTADOS	67
3.4 DISCUSSÃO	70
3.5 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICE	78
4 CONCLUSÕES GERAIS	79
REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO GERAL

A jararaca da Amazônia (*Bothrops atrox*) tem vasta área de ocorrência no norte da América do Sul, possuindo ampla distribuição em toda bacia Amazônica (WÜSTER et al., 1996; CAMPBELL; LAMAR, 2004). Por ser uma das serpentes mais encontradas na região amazônica brasileira, possui grande importância ecológica e interesse para a saúde pública, uma vez que é a serpente peçonhenta que mais causa acidentes (PARDAL et al., 1995; SÁ NETO; SANTOS, 1995). No entanto, sua distribuição é ainda controversa, assim como sua taxonomia (WUSTER et al., 1996; 1997; MARTINS et al., 2001). Diversos estudos morfológicos e moleculares mostraram que as populações da Amazônia central (Manaus) são distintas das populações da Amazônia oriental (Pará, Ilha do Marajó), sendo estas consideradas como *B. marajoensis* (WUSTER et al., 1996; 1997; 1999; MARTINS et al., 2001). Porém, mais informações são necessárias, pois além de o status de *B. marajoensis* permanecer incerto, a espécie é pouco distinta de *B. atrox* (WUSTER et al., 1996; WUSTER et al., 2002).

B. atrox, é uma serpente de hábito predominantemente noturno, podendo também ser encontrada ativa durante o dia (OLIVEIRA; MARTINS, 2001; OLIVEIRA, 2003; TURCI et al., 2009) e apresenta dieta generalista constituída por centopéias, pequenos mamíferos, anfíbios, lagartos (MARTINS; OLIVEIRA, 1998; CAMPBELL; LAMAR, 2004; BERNARDE; ABE, 2010), outras serpentes (MARTINS; GORDO, 1993), e peixes (OLIVEIRA; MARTINS, 2003). Quanto ao comprimento corporal a jararaca da Amazônia pode atingir 1207.5 mm (MARTINS et al., 2001), no entanto, dados sobre tamanho da maturidade sexual são escassos.

O ciclo reprodutivo de *B. atrox* é pouco estudado e a maioria das informações disponíveis na literatura é proveniente de observações de nascimentos em cativeiro ou de fêmeas coletadas prenhes (BEEBE, 1946; FITCH, 1970; CUNHA; NASCIMENTO, 1975; 1978; 1982; DIXON; SOINI, 1986; FERNANDES et al., 1993; OLIVEIRA, 2003). Um dado bastante importante foi obtido no campo, por Oliveira (2003), foram encontrados três casais copulando em abril e maio, e em cativeiro cópulas foram observadas no mês de junho.

Entretanto, diversos aspectos básicos da biologia reprodutiva da jararaca da Amazônia, como a descrição do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas, a maturidade sexual, a fecundidade e a época de nascimento dos filhotes permanecem insuficientes e pontuais. Assim, a investigação de estratégias relacionadas aos ciclos, como se há estocagem de

esperma e o tipo de estocagem, além de outros aspectos reprodutivos, permitiriam uma melhor compreensão e integração dos ciclos femininos e masculinos, bem como da história natural da espécie.

Dessa forma, este trabalho utilizou várias ferramentas, como análises morfológicas, anatômicas e microscópicas, para descrever a biologia reprodutiva de machos e fêmeas de *B. atrox*.

2 BIOLOGIA REPRODUTIVA DE MACHOS E FÊMEAS DA JARARACA DA AMAZÔNIA *BOTHROPS ATROX*: UMA ABORDAGEM MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA

2.1 INTRODUÇÃO

O estudo da biologia reprodutiva em répteis Squamata compreende uma diversidade de fatores biológicos importantes para diversos campos da ciência, levando em consideração aspectos comportamentais, fisiológicos, ecológicos e da evolução da espécie em estudo. Essa integração possibilita a interpretação dos ciclos reprodutivos, tamanho da maturidade sexual, dimorfismo sexual, fecundidade, modos reprodutivos, e comportamentos reprodutivos, como corte e cuidado parental (SEIGEL; FORD, 1987; SHINE, 2003; SHINE; BONNET, 2009).

Os ciclos reprodutivos das serpentes apresentam diversas classificações, sendo a gametogênese a principal ferramenta utilizada para classificá-los. Schuett (1992) classificou os ciclos em quatro tipos: tipo I - pós-nupcial ou dissociado, a produção de gametas é posterior à época de cópula e exige estocagem de esperma obrigatória no trato reprodutivo dos machos ou das fêmeas; tipo II – misto, a produção de gametas ocorre no final da primavera, com interrupção no inverno e finalização apenas na primavera; tipo III - pré-nupcial ou associado, a produção de gametas coincide ou precede a época de acasalamento, e tipo IV - contínuo, a espermatogênese ocorre durante todo o ano.

Mais recentemente, foi proposta por Mathies (2011) uma nova classificação na qual os ciclos são avaliados a nível individual e populacional. O ciclo a nível individual pode ser classificado em: descontínuo cíclico (as gônadas apresentam regressão total em algum período do ano); contínuo cíclico (não há regressão completa, mas sim uma redução na produção de gametas) e acíclico (produção contínua de gametas). Já a nível populacional, o ciclo descontínuo e contínuo podem ser sazonal sincrônico ou semi-sincrônico (a sincronia entre os indivíduos não é marcadamente fechada), ou pode ser asazonal, quando há ausência de sincronia entre os indivíduos.

Alguns estudos sugerem que ciclos contínuos e asazonais são encontrados para serpentes de regiões tropicais, em função das condições climáticas estáveis (temperatura e pluviosidade) (DUELLMAN, 1978; FITCH, 1982; VITT; VANGILDER, 1983). Entretanto, segundo Mathies (2011), somente machos podem apresentar ciclos contínuos e acíclicos.

Todas as fêmeas de serpentes exibem ciclo reprodutivo descontínuo, com padrão sazonal, pois diferentemente de machos, o recrutamento dos folículos para iniciar a vitelogênese secundária geralmente é longo e requer um custo energético muito alto (CALLARD; KLEIS, 1987; MATHIES, 2011). A vitelogênese é a transformação dos oócitos em folículos e é classificada em vitelogênese primária (quiescência folicular) e secundária (fase ativa e depósito de vitelo nos folículos) (ALDRIDGE, 1979).

Basicamente todas as fêmeas de serpentes apresentam ciclo descontínuo (sazonal). Mas há aquelas espécies que não podem ser definidas como sazonalmente sincrônicas ou definitivamente asazonais. Esse é o caso de alguns colubrídeos tropicais, como: *Geophis brachycephalus* (SASA, 1993); *Geophis hoffmanni* (GOLDBERG, 2006); *Liophis jaegeri* (FROTA, 2005); *Liophis semiaureus* (BONFIGLIO, 2007); *Oxybelis fulgidus* (SCARTOZZONI; SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2009); dentre outras espécies (MATHIES, 2011). Portanto, para essas espécies a reprodução é caracterizada como estendida. A reprodução estendida aplica-se quando a vitelogênese secundária é longa entre 6 a 10 meses e as fêmeas estão prenhes durante vários meses do ano de 4 a 7 meses (MATHIES, 2011).

Em machos de serpentes, geralmente o ciclo reprodutivo é inferido pelo aumento do comprimento/massa que ocorre nos testículos devido à intensa atividade espermatogênica durante a fase ativa (SCHUETT et al., 2002; KROMER; MARTINEZ; MASON, 2004). No entanto, para melhor caracterização do ciclo, não basta somente análises macroscópicas, são necessárias também análises microscópicas dos túbulos seminíferos, podendo assim caracterizar com precisão a etapa do ciclo testicular pelas mudanças no epitélio seminífero (MATHIES, 2011).

Além dos testículos, o ducto deferente é muito utilizado para verificar o status de maturidade sexual (SHINE, 1977). Além disso, é o principal órgão de estocagem de esperma nos machos, estratégia muito importante entre as espécies que apresentam ciclo descontínuo e dissociado (cópula não correspondente ao período da atividade testicular). A estocagem tem sido descrita em várias famílias de serpentes, tais como colubrídeos (SAINT- GIRON, 1982), elapídeos (ALMEIDA-SANTOS; MARQUES; PIZZATTO, 2006), e em viperídeos (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012).

Outro fator importante a ser estudado na reprodução dos machos de serpentes, é o segmento sexual renal (SSR). O SSR localizado no rim é uma porção especializada do néfron, formado por um epitélio simples, constituído de células colunares com núcleo basal e

presença de grânulos sexuais espalhados por todo o citoplasma (SEVER et al., 2002; KROMER; MARTINEZ; MASON, 2004). Uma característica importante que associa o SSR com a reprodução, é a hipertrofia dessa região, geralmente na época de acasalamento e com o aumento da atividade testicular (SCHUETT et al., 2002; SEVER et al., 2002). Tal fato é decorrente da associação do SSR com o hormônio testosterona (SCHUETT et al., 2002; KROMER; MARTINEZ; MASON, 2004). A função do segmento sexual renal permanece ainda desconhecida, mas com inúmeras hipóteses. Uma das hipóteses é a participação do SSR na sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino (ALDRIDGE et al., 2011). Em fêmeas de serpentes a hipertrofia do SSR não ocorre, mas pode ser estimulada por andrógenos (KROMER; MARTINEZ; MASON, 2004).

Apesar de um nítido avanço (BARBO et al., 2012) informações sobre biologia reprodutiva das jararacas neotropicais são incipientes, uma vez que o gênero *Bothrops* compreende cerca de 50 espécies distribuídas na América do Sul e Central (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

As espécies de jararacas estudadas quanto à biologia reprodutiva são: *B. asper* (SOLÓRZANO; CERDAS, 1989; SASA; WASCO; LAMAR, 2009), *B. erythromelas* (BARROS, 2011), *B. insularis* (KASPEROVICZUS, 2009), *B. jararaca* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; KASPEROVICZUS, 2013), *B. leucurus* (BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a), *B. matogrossensis* (MONTEIRO et al., 2006), *B. moojeni* (NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003), *B. pauloensis* (VALDUJO; NOGUEIRA; MARTINS, 2002; SILVA et al., 2013). Dentre estas, apenas *B. asper*, *B. erythromelas*, *B. insularis*, *B. jararaca* e *B. leucurus* são conhecidos ciclo reprodutivo masculino. De forma geral, nas espécies do gênero *Bothrops* estudadas, fêmeas e machos apresentam ciclos reprodutivos descontínuos e sazonais (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002). Estas espécies possuem algumas características reprodutivas conservadas, como período de cópula no outono/inverno e nascimento dos filhotes no verão – na estação mais chuvosa. Tal conservantismo pode ser influenciado pela inércia filogenética (BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a), entretanto, mais estudos são necessários para caracterizar tais influências genéticas. Outros fatores como as condições ambientais (fotoperíodo, temperatura e umidade) e disponibilidade de alimento, podem ser determinantes nas estratégias reprodutivas abordadas entre as espécies do gênero *Bothrops* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; SASA; WASCO; LAMAR, 2009; BARROS, 2011; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a). A temperatura em serpentes parece ser um dos fatores mais importantes no período reprodutivo. Lutterschmidt e Mason (2009) observaram que a

temperatura, na ausência do fotoperíodo, foi suficiente para modular as concentrações de andrógenos no período reprodutivo.

A espécie *B. atrox* distribui-se em localidades, com clima equatorial quente e úmido o que acaba tornando as condições ambientais mais favoráveis. Além disso, a Amazônia é distinta das demais regiões habitadas (Mata Atlântica, Pampas, Cerrado e Caatinga) pelas demais *Bothrops* estudadas. Dessa forma, teria o habitat Amazônico influência na determinação do tipo de ciclo reprodutivo empregado pela jararaca da Amazônia? Ou o ciclo seria conservado como nas demais *Bothrops*?

Assim, o objetivo desse trabalho foi descrever a biologia reprodutiva de machos e fêmeas de *Bothrops atrox*. Pretende-se ainda, determinar se há influências de fatores ambientais, como temperatura e precipitação atuando nos principais eventos reprodutivos da espécie.

2.2 MATERIAL E MÉTODO

Foram analisados 325 espécimes de *Bothrops atrox* (62 fêmeas, 79 machos e 184 indivíduos imaturos), provenientes da Amazônia brasileira (Figura 1), preservados nas seguintes coleções científicas: Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Acre (UFAC); Laboratório de Pesquisas Zoológicas das Faculdades Integradas do Tapajós, Pará (LPZ); Coleção Herpetológica de Anfíbios e Répteis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA); Coleção de Referência da Herpetofauna de Rondônia (CRHRO); Coleção de Répteis do Museu de Zoologia da Unicamp (ZUEC); Coleção de Vertebrados, Mato Grosso (UFMT); Coleção do Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ) e Coleção do Museu de Ciência e Tecnologia da PUC (MCP-PUC/RS) (Apêndice A).

Figura 1 – Distribuição geográfica dos espécimes analisados

Fonte: (BRAZ, H. B., 2014).

Para caracterizar o clima da região Amazônica foram elaborados climatogramas de todos os municípios amostrados (Figuras 1 e 2). Para tanto, utilizou-se o programa DIVA-GIS 7.1.7, a partir da base de dados WorldClim (clima atual: 1950-2000), versão 1.3 de outubro de 2004, resolução de 10 minutos. De maneira geral, as áreas localizadas dentro do domínio do bioma Amazônico, possuem clima equatorial quente, com temperaturas médias (entre 25 e 26 °C) relativamente constantes ao longo do ano (mínimas entre 18 e 24 °C e máximas entre 27 e 34 °C) e duas estações bem definidas: seca e chuvosa (Figura 2A, B, C, D, E). Para melhor compreensão das estratégias reprodutivas a nível estatístico, a estação chuvosa foi dividida em: IEC (início da estação chuvosa - novembro, dezembro e janeiro) e FEC (final da estação chuvosa - fevereiro, março e abril). E a estação seca foi dividida em: IES (início da estação seca - maio, junho e julho) e FES (final da estação seca - agosto, setembro e outubro).

Figura 2 – Médias dos padrões climáticos dos municípios amostrados

Foram coletados de todos os indivíduos da jararaca da Amazônia os seguintes dados morfológicos: (1) comprimento rostro-cloacal (CRC; com fita métrica milimetrada; mm), (2) comprimento da cauda (CC; fita métrica milimetrada; mm) e (3) sexo (exame gonadal).

O dimorfismo sexual no tamanho do corpo (CRC) foi testado por teste-*t* de Student (ZAR, 1999). As análises foram realizadas no programa Instat, com $P < 0,05$ como critério de significância. As médias de CRC foram comparadas entre machos e fêmeas, separadamente em adultos e filhotes, a fim de se evitar problemas relacionados a mudanças ontogenéticas na forma do corpo (KING, 1989). Para comparar o índice de dimorfismo sexual entre indivíduos adultos em relação ao tamanho corporal utilizou-se a fórmula: $SSD = 1 - [\text{CRC médio dos adultos do sexo de maior tamanho} / \text{CRC médio dos adultos do sexo de menor tamanho}]$ conforme Shine (1994).

Já para comparações de tamanho de cauda (CC), foram utilizadas análises de covariância (ANCOVA), de forma a eliminar o efeito do tamanho do corpo para cada variável (MARTINS et al., 2001). E utilizou-se ANCOVA, porque análises preliminares mostraram que o CRC foi correlacionado com o CC ($r = 0,54$; $P < 0,0001$). Desta forma, foi utilizada como variável dependente o CC, e como co-variável o CRC. Todas as variáveis morfológicas foram transformadas em seu logaritmo natural (ZAR, 1999).

Quanto aos filhotes, além dos dados morfológicos, foram observadas as pigmentações da região gular e a coloração da ponta da cauda para constatar possíveis diferenças nas colorações (Anexo A).

Em relação à maturidade sexual, fêmeas foram consideradas maduras quando apresentavam ovos e/ou embriões nos ovidutos ou folículos secundários e/ou corpo albicans nos ovários e/ou oviduto distendido (“pós-parto”). Entre os machos, foram determinantes para a condição de macho sexualmente maduro a presença de ductos deferentes enovelados, com confirmação histológica, da presença de espermátides e/ou espermatozóides nos testículos e ductos deferentes.

Para as fêmeas, o ciclo reprodutivo foi caracterizado pela distribuição ao longo do ano do tamanho dos folículos ovarianos, dos ovos e dos embriões nos ovidutos. Para isso, os seguintes dados foram coletados com auxílio de paquímetro digital (precisão 0,1 mm): (1) diâmetro do maior folículo ovariano ou presença de embriões; (2) presença/ausência de contração muscular uterina (UMT – uterine muscular twisting) na porção distal do útero; (3) aspecto geral dos ovidutos (liso ou pregueado); e (4) presença de corpo lúteo ou albicans nos ovários.

A fecundidade foi realizada pela contagem do número de folículos em vitelogênese secundária avançada (> 16 mm; $n = 7$), ou ovos/embriões no útero de fêmeas reprodutivas e filhotes recém-nascidos em cativeiro ($n = 13$). A relação entre o comprimento rostro-cloacal da fêmea e o número de folículos vitelogênicos e embriões foi testado por regressão linear. Entre as fêmeas grávidas, foi possível caracterizar o estágio de desenvolvimento dos embriões em três fases: fase 1: muito vitelo e um pequeno embrião visível, provável fecundação recente; fase 2: o vitelo ainda é abundante, embrião mais visível; fase 3: embrião em estágio avançado de desenvolvimento e com pouco ou nenhum vitelo aparente (PIZZATTO; MARQUES, 2007).

Para os machos, o ciclo reprodutivo foi caracterizado de acordo com a coleta dos seguintes dados morfológicos: (1) comprimento, largura e espessura dos testículos direito e esquerdo visando a determinação do volume testicular (VT) segundo a fórmula para o volume

da elipsóide ($VT = 4/3 \cdot \pi \cdot a \cdot b \cdot c$, onde a = metade do comprimento, b = metade da largura, c = metade da espessura); (2) aspecto (liso/opaco/enovelado), diâmetro dos ductos deferentes direito e esquerdo na sua porção mais alargada, na região distal próxima à região da cloaca e (3) comprimento e largura total do rim direito para determinar a hipertrofia do segmento sexual renal. Tais medidas foram obtidas utilizando-se paquímetro digital com precisão de 0,1 mm.

O volume relativo dos testículos, o diâmetro relativo dos ductos deferentes e o comprimento e largura relativo dos rins, foram obtidos a partir dos resíduos das regressões lineares entre essas variáveis e o CRC dos machos. Os resíduos foram utilizados para eliminar a influência do tamanho do corpo sobre as variáveis de interesse (MARQUES et al., 2006) e serviram apenas para ilustração dos ciclos. Diferenças no volume dos testículos, diâmetros dos ductos deferentes e comprimento e largura dos rins direito ao longo do ano foram testadas utilizando-se análise de covariância (ANCOVA). Isso porque, análises preliminares indicaram correlação entre essas variáveis com o comprimento rostro-cloacal (CRC). Volume dos testículos ($r = 0,62$; $P < 0,0001$), diâmetros dos ductos deferentes ($r = 0,52$; $P < 0,0001$) e comprimento ($r = 0,80$; $P < 0,0001$) e largura ($r = 0,42$; $P = 0,001$) dos rins direito.

Além dos dados morfológicos coletados de machos e fêmeas adultos, foram coletados ainda as seguintes amostras para histologia: fêmeas: útero posterior, vagina e infundíbulo posterior, para verificar espermatozoides no trato genital das fêmeas; machos: testículo, ducto deferente e rim ($n=65$), para verificar o ciclo espermatogênico (Quadro 1), estocagem de espermatozoides e hipertrofia do segmento sexual renal. De todos os órgãos foram coletados pequenos fragmentos (1cm), preservados em álcool 70% e processados para microscopia de luz pelo método de parafina. A espessura dos cortes transversais foi de 5 μ m, corados pelo método de coloração básica, hematoxilina-eosina (H/E) (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979).

Quadro 1 – Classificação dos estágios testiculares

Estágios	Descrição dos túbulos seminíferos
1	Regressão completa; túbulos seminíferos somente com poucas espermatogônias e células de Sertoli; podem ter poucos espermatozoides na luz do lúmen.
2	Espermatogônias aumentando e dividindo-se; espermatócitos primários.
3	Espermátides em metamorfose com poucos espermatozoides.
4	Espermio gênese; espermatozoides maduros no lúmen (nível máximo de espermio gênese).
5	Espermatozoides abundantes, porém, espermatócitos muito reduzidos; espermátides reduzidas, porém ainda em transformação.
6	Epitélio germinal reduzido, com poucas espermatogônias, espermatócitos e espermátides; podem conter ou não espermatozoides no lúmen de uma a duas camadas de células.

Fonte: (GOLDBERG; PARKER, 1975; MCPHERSON; MARION, 1981; SAINT-GIRONS, 1982; KASPEROVICZUS, 2009).

Somente para os machos foram tiradas medidas morfométricas com o auxílio do programa ImageJ version 1.46 (RASBAND, 2011). Para cada animal foram obtidas de seis a dez medidas a fim de se obter uma média para cada variável. Do testículo, as medidas obtidas foram: o diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio seminífero (Figura 3A). Do rim foram registradas as medidas do segmento sexual renal: diâmetro dos túbulos e altura do epitélio (Figura 3B). Todas as medidas foram testadas pelo Anova e diferenças significativas foram analisadas pelo teste Post-hoc de comparações múltiplas.

Figura 3 – Medidas registradas nos cortes histológicos. Hematoxilina e eosina, 40x

Fonte: (SILVA, K. M. P., 2014).

Legenda: (A) Túbulos seminíferos, DTS = diâmetro do túbulo seminífero; AES = altura do epitélio seminífero. (B) Segmento sexual renal, DTSSR = diâmetro tubular do segmento sexual renal; AEISSR = altura epitelial do segmento sexual renal.

Antes das análises estatísticas, todos os dados foram verificados quanto a sua normalidade e homogeneidade de variâncias. As análises estatísticas foram feitas com ajuda dos softwares Instat e Statistica versão 7. Os gráficos foram elaborados nos softwares Microsoft Office Excel 2010 e Statistica 7.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Dimorfismo e maturidade sexual

Foi encontrado dimorfismo sexual no comprimento rostro-cloacal e comprimento da cauda em indivíduos adultos de *B. atrox*, com fêmeas apresentando maior tamanho corporal ($t = 6,680$; $gl = 135$; $P < 0.0001$; Tabela 1) e machos apresentando caudas maiores (ANCOVA, $F_{1,13} = 94,38$; $P = 0,0000$; Tabela 1). O índice de dimorfismo sexual (SSD) foi de 0,22.

Em relação à maturidade sexual, o menor macho sexualmente maduro possuía 537 mm de CRC, apresentando ductos deferentes enovelados e com espermatozoides no lúmen (Figura 4). Já a menor fêmea madura apresentou 690 mm de CRC, contendo folículos vitelogênicos de 21.46 mm.

Tabela 1 – Dados morfológicos dos adultos machos e fêmeas de *B. atrox*. Comprimento da cauda relativo indica a porcentagem ocupada pela cauda no CRC. DP = desvio padrão

Variável	Machos			Fêmeas		
	Média ± DP	Mínimo-Máximo	<i>n</i>	Média ± DP	Mínimo-Máximo	<i>n</i>
CRC (mm)	763,6 ± 138,7	537-1116	77	938,9 ± 168,5	690-1369	60
CC (mm)	134,8 ± 30,9	100-200	77	145,2 ± 26,7	94-210	59
CC Relativo (%)	18,0 ± 1,1	15,3-21,3	77	15,5 ± 1,2	12,0-17,2	59

Figura 4 – Histologia de corte transversal, ducto deferente com espermatozoides no lúmen em abril (FEC), 10x. Hematoxilina e eosina

Fonte: (SILVA, K. M. P., 2014).

2.3.2 Biologia reprodutiva das fêmeas

As fêmeas apresentaram folículos em vitelogênese primária ao longo de todo ano, já folículos em vitelogênese secundária foram encontrados apenas entre os meses de janeiro a agosto (estação chuvosa e seca). Fêmeas prenhes foram encontradas nas estações chuvosa e seca, janeiro ($n = 1$), abril ($n = 2$), julho ($n = 4$), outubro ($n = 1$) e dezembro ($n = 1$). Filhotes

recém-nascidos foram encontrados em janeiro ($n = 1$, com 199 mm de CRC); outubro ($n = 1$, com 156 mm de CRC, presença de cordão umbilical) e novembro ($n = 1$, com 182 mm de CRC). Foram observados nascimentos em cativeiro na região amazônica (Rio Branco, Acre e Santarém, Pará), duas ninhadas em agosto com filhotes medindo entre 222 a 254 mm de CRC; duas ninhadas em setembro com filhotes medindo entre 170 a 217 mm de CRC e uma ninhada em outubro e novembro com filhotes medindo entre 170 a 180 mm de CRC (Figura 5 e 6). Além disso, uma fêmea pós-parto foi analisada em janeiro, apresentou útero distendido e corpo albicans nos ovários (Figura 7).

Figura 5 – Ciclo reprodutivo da jararaca da Amazônia

Legenda: Círculo fechado: vitelogênese primária; Círculo aberto: vitelogênese secundária; Triângulo: embrião em fase 1; Quadrado aberto: embrião em fase 2; Quadrado fechado: embrião em fase 3; * Fêmeas prenhes (comunicação pessoal)¹; A: acasalamento (OLIVEIRA, 2003; este estudo); N: nascimentos (OLIVEIRA, 2003; comunicação pessoal²; comunicação pessoal³; este estudo).

¹ Informação fornecida pelo Mestre em ecologia Rafael de Fraga, em junho de 2014.

² Informação fornecida pelo Professor Dr. Moisés Barbosa de Souza, em junho de 2014.

³ Informação fornecida pela Bióloga Isla Carol Marialva Camargo, em dezembro de 2014.

Figura 6 – Resumo do ciclo reprodutivo das fêmeas e machos de *B. atrox*

Fonte: (SILVA, K. M. P., 2014).

Legenda: IEC = início da estação chuvosa; FEC = final da estação chuvosa; IES = início da estação seca; FES = final da estação seca.

Figura 7 – Fêmea pós-parto

Fonte: (SILVA, K. M. P., 2014).

Legenda: (A) Quadrado: útero distendido. (B) Fotomicrografia do Corpo albicans, 40x, Hematoxilina e eosina. EO: estroma ovariano; CL: células luteínicas; TCF: tecido conjuntivo fibroso.

A fecundidade foi positiva e significativamente relacionada com o comprimento rostro-cloacal das fêmeas ($r = 0,65$; $P = 0,002$; $n = 20$ Figura 8). A média de folículos em estágio avançado de depósito de vitelo, ou de embriões nos ovidutos e filhotes recém-nascidos em cativeiro foi de $10,8 \pm 7,0$ (amplitude = 3-32; $n = 20$). O tamanho dos filhotes preservados ($n = 49$) apresentou média de CRC = $228,0 \pm 22,7$ mm (amplitude = 156-254 mm), CC = $39,8 \pm 5,3$ mm (amplitude = 27-50 mm).

Figura 8 – Relação entre comprimento rostro-cloacal da fêmea de *B. atrox* e número de folículos em vitelogênese secundária, embriões e filhotes. Circulo vermelho: filhotes recém-nascidos em cativeiro; Circulo fechado: embriões; Circulo aberto: folículos > 16mm

Fêmeas de *Bothrops atrox* apresentaram espermatozoides agregados no útero posterior ($n = 2$) e no infundíbulo posterior ($n = 3$). Todas as fêmeas estavam em vitelogênese secundária e no período de acasalamento – março e abril.

2.3.3 Biologia reprodutiva dos machos

O ciclo espermatogênico de *B. atrox* é descontínuo cíclico a nível individual e sazonal semi-sincrônico a nível populacional. Diferentes estágios testiculares foram encontrados ao longo do ano (Quadro 1): A regressão testicular - estágio 1 foi encontrado em três períodos do ano (FEC em abril $n = 3$; IES $n = 10$; FES em setembro $n = 1$). Espermátides em metamorfose - estágio 3 foi encontrado em todos os períodos (IEC $n = 5$; FEC $n = 7$, IES em junho $n = 1$; e FES em outubro $n = 4$). Já a espermiogênese - estágio 4 foi encontrado em dois períodos (IEC $n = 5$; FEC em fevereiro e março $n = 11$). No entanto, alguns eventos foram mais marcados em determinados períodos do ano como: a regressão testicular foi muito mais marcada no IES, e a espermiogênese foi mais marcada no IEC e FEC. Além disso, no IEC foi encontrado apenas os estágios 3 e 4 (Figura 9).

Figura 9 – Estágios testiculares de *B. atrox*. Hematoxilina e eosina

Fonte: (SILVA, K. M. P., 2014).

Legenda: (A) Regressão testicular no IES – estágio 1 (10x). (B) Espermátides em metamorfose – estágio 3 (10x). (C) Espermiogênese no IEC – estágio 4 (10x). (D) Altura máxima do epitélio seminífero durante o IEC – estágio 4 (40x).

As medidas do diâmetro do túbulo seminífero e altura do epitélio seminífero, juntamente com as análises estatísticas das médias dessas medidas, confirmam as informações anteriormente citadas. O diâmetro do túbulo seminífero variou entre o IEC e IES (ANOVA, $F_{3,43} = 6,82$; $P = 0,0007$; Figura 10). E a altura do epitélio seminífero, diferiram entre IEC e FEC, IEC e IES (ANOVA, $F_{3,42} = 6,34$; $P = 0,002$; Figura 10). Já as medidas macroscópicas do volume testicular também diferiram entre o IEC e IES (ANCOVA, $F_{3,57} = 2,61$; $P = 0,06$; Figura 10).

Assim, o início da espermatogênese inicia no FES (setembro) e ainda pode-se observar neste mesmo período, túbulos seminíferos com epitélio bastante espesso em estágio 3. No entanto, em três indivíduos, nos estados respectivamente, Acre, Rondônia e Pará, a espermatogênese - divisão das células germinativas iniciou no IES (maio, junho e julho). A espermiogênese, nível máximo de produção de espermatozoides, foi observada somente no

IEC (novembro, dezembro e janeiro) e FEC.(fevereiro, março e abril). A regressão testicular inicia no FEC (março) e no IES (maio, junho e julho) a maioria dos indivíduos analisados apresentou o epitélio do túbulo seminífero formado basicamente por espermatogônias, caracterizando a fase quiescente (Figura 6).

O diâmetro dos ductos deferentes não variou entre os períodos (IEC, FEC, IES e FES), apresentou espermatozoides estocados ao longo do ano (ANCOVA, $F_{3,60} = 1,38$; $P = 0,255$, Figura 10).

Figura 10 – Ciclo reprodutivo dos machos

Legenda: (A) Volume relativo dos testículos. (B) Volume relativo dos ductos deferentes. (C) Média do diâmetro dos túbulos seminíferos. (D) Média da altura do epitélio seminífero.

Em relação ao rim, não foram encontradas diferenças quanto ao comprimento (ANCOVA, $F_{3,54} = 0,68$; $P = 0,5679$; Figura 11) e diâmetro (ANCOVA, $F_{3,49} = 0,66$; $P = 0,58$; Figura 11) do rim direito. No entanto, as análises histológicas e estatísticas apontam diferenças no diâmetro tubular do SSR entre o IEC e FES, e entre FEC e FES (ANOVA, $F_{3,40} = 4,52$; $P = 0,008$, Figura 11 e 12), assim como na altura do epitélio do SSR, que diferiu entre, o IEC e FES, FEC e IES e, FEC e FES (ANOVA, $F_{3,40} = 6,08$; $P = 0,002$; Figura 11).

Dessa forma, o SSR de *B. atrox* apresenta um ciclo sazonal, caracterizado por uma hipertrofia dos túbulos contorcidos distais no IEC e FEC, enquanto no IES inicia-se a diminuição do SSR. E no FES o diâmetro e altura do epitélio do SSR encontram-se regredidos (Figura 6).

Figura 11 – Medidas macroscópicas do rim direito e microscópicas do segmento sexual renal

Legenda: (A) Comprimento do rim. (B) Diâmetro do rim. (C) Diâmetro tubular do segmento sexual renal. (D) Altura do epitélio do segmento sexual renal.

Figura 12 – Segmento sexual renal (SSR). Hematoxilina e eosina

Fonte: (SILVA, K. M. P., 2014).

Legenda: (A) Túbulos distais hipertrofiados, 10x. (B) Túbulos distais hipotrofiados, 10x.

2.4 DISCUSSÃO

O dimorfismo sexual no tamanho do corpo e cauda é comumente observado entre as espécies do gênero *Bothrops*. Fêmeas apresentam maiores tamanhos corporais e machos caudas maiores. Além disso, as fêmeas também apresentam maturidade sexual mais tardia do que os machos e com tamanho corporal maior (VALDUJO; NOGUEIRA; MARTINS, 2002; HARTMANN; MARQUES; ALMEIDA-SANTOS, 2004; MONTEIRO et al., 2006; NUNES et al., 2010; BARROS, 2011; KASPEROVICZUS, 2013). A vantagem de fêmeas atingirem

maiores tamanhos e maturidade sexual tardia em relação aos machos está relacionada aos benefícios reprodutivos, o qual aumentariam as possibilidades de gerar mais descendentes (SHINE, 1993; 1994). Tal fato foi observado em *B. atrox*, uma vez que o tamanho corporal das fêmeas foi correlacionado com o tamanho da ninhada. A média das ninhadas varia de 3 a 32 filhotes. Assim, a fecundidade obtida para as fêmeas de *B. atrox* foi semelhante à fecundidade de *B. moojeni* e *B. leucurus*, espécies do grupo *atrox*. O tamanho da ninhada em *B. moojeni* pode variar entre 3 a 32 filhotes (NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003). Em *B. leucurus* o tamanho da ninhada varia entre 3 a 29 filhotes (BARROS, 2011). Já *B. asper*, serpente com tamanho corporal maior em relação às demais espécies do grupo *atrox*, as fêmeas apresentam fecundidade mais elevada, a ninhada pode variar de 5 a 86 filhotes (SASA; WASKO; LAMAR, 2009).

Geralmente, em espécies nas quais ocorre o combate entre os machos, os machos são maiores que as fêmeas e o índice de dimorfismo sexual de tamanho (SSD) apresentam valores negativos (SHINE, 1994). Entretanto, isso não ocorre nas espécies do grupo *atrox* que apresentam combate (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002) e SSD com valores positivos: *B. atrox* (SSD: 0.22, este estudo), em *B. moojeni* (SSD: 0.25, NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003) e *B. leucurus* (SSD: 0.02, BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a). Outras espécies do gênero *Bothrops* que não apresentam combate, o SSD é semelhante: *B. jararaca* (SSD: 0.21, KASPEROVICZUS, 2013); *B. pubescens* (SSD: 0.39, HARTMANN; MARQUES; ALMEIDA-SANTOS, 2004) e *B. alternatus* (SSD: 0.49, NUNES et al., 2010).

No entanto, os machos de *B. atrox*, *B. leucurus* e *B. moojeni* podem atingir tamanhos corporais maiores em relação às espécies do gênero *Bothrops* que não apresentam combate. Tamanho corporal máximo das espécies que apresentam combate: *B. atrox* (machos: 1116 mm de CRC; fêmeas: 1369 mm de CRC); *B. leucurus* (machos: 1270 mm de CRC; fêmeas: 1360 mm de CRC, BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a); *B. moojeni* (machos: 1060 mm de CRC; fêmeas: 1330 mm de CRC, NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003). Tamanho corporal máximo das espécies que não apresentam combate: *B. jararaca* (machos: 980 mm de CRC; fêmeas: 1383 mm de CRC, KASPEROVICZUS, 2013); *B. alternatus* (machos: 664 mm de CRC; fêmeas: 992 mm de CRC, NUNES et al., 2010); *B. pubescens* (machos: 830 mm de CRC; fêmeas: 1115 mm de CRC, HARTMANN; MARQUES; ALMEIDA-SANTOS, 2004). Entretanto, na espécie *B. pauloensis* os machos atingem tamanho máximo de 685 mm de CRC (VALDUJO; NOGUEIRA; MARTINS, 2002), e

apresentam comportamento agonístico, repertório bastante agressivo no período de cópula (SILVA et al., 2013).

O ciclo reprodutivo das fêmeas de serpentes, recentemente tem sido muito discutido a nível populacional, como sazonais ou asazonais. Os ciclos sazonais encontram-se as espécies de serpentes de regiões temperadas e a maioria de regiões tropicais. Os ciclos asazonais são conhecidos apenas para espécies tropicais, devido principalmente às condições ambientais estáveis, como temperatura e pluviosidade (DUELLMAN, 1978; JAMES; SHINE, 1985; MATHIES, 2011).

As fêmeas do gênero *Bothrops*: *B. erythromelas* (BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014b), *B. asper* (SASA; WASKO; LAMAR, 2009), *B. matogrossensis*, (MONTEIRO et al., 2006), *B. moojeni* (NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003), *B. jararaca*, (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002), *B. insularis* (KASPEROVICZUS, 2009) e *B. neuwiedi* (HARTMANN; MARQUES; ALMEIDA-SANTOS, 2004), apresentam ciclos reprodutivos sazonais. A vitelogênese secundária é bastante estendida, geralmente com início no verão ou outono (período de cópula), finalizando na primavera. Entre a cópula e o término da vitelogênese secundária os espermatozoides permanecem estocados até a fertilização na primavera. A prenhez ocorre na primavera e verão e os nascimentos são concentrados principalmente na estação chuvosa – verão (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002).

As espécies com distribuição em regiões mais quentes do Brasil, como cerrado e caatinga, fêmeas apresentam maior plasticidade no ciclo, porém com sincronia principalmente nos nascimentos. Por exemplo, a espécie *B. pauloensis* fêmeas prenhes são encontradas a partir de junho a outubro (início do desenvolvimento fetal) até dezembro (embriões totalmente formados), e os nascimentos ocorreram somente na primavera e verão (VALDUJO; NOGUEIRA; MARTINS, 2002). Em *B. leucurus*, serpente do grupo atrox, fêmeas prenhes foram encontradas na primavera, no entanto, foi encontrada uma fêmea prenhe em maio, no mesmo período de cópula. Já os nascimentos em *B. leucurus*, ocorrem no verão e no início do outono (BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a).

O ciclo reprodutivo das fêmeas de *B. atrox* foi caracterizado como estendido e a vitelogênese secundária foi sazonal. Para a jararaca da Amazônia a cópula ocorre principalmente no FEC (abril) e IES (maio e junho) (OLIVEIRA, 2003), entretanto, observamos uma fêmea com estocagem de espermatozoides em março na região do útero posterior e infundíbulo posterior, indicando possivelmente uma recente cópula, como observado em *B. jararaca* (KASPEROVICZUS, 2013). Em relação ao período de prenhez e

parturição, as fêmeas de *B. atrox* apresentaram ausência de sincronia. Foram encontradas fêmeas prenhes em fase 1 (início do desenvolvimento embrionário) no mês de outubro, fase 2 (embrião visível, mas apresentando vitelo ainda abundante) no mês de julho e em fase 3 (embrião em estágio avançado de desenvolvimento, com pouco ou nenhum vitelo) nos meses de julho e dezembro. Além disso, foram encontradas fêmeas prenhes em todos os períodos do ano, no início e final da estação chuvosa e no início e final da estação seca. Outros trabalhos também revelaram a extensão de fêmeas prenhes em diferentes períodos do ano: populações de *B. atrox* da Guiana Inglesa, fêmeas prenhes foram encontradas em maio, junho, setembro e outubro (BEEBE, 1946); populações do Peru, em julho e setembro (DIXON; SOINI; 1986); e as populações do Equador, em julho e novembro (DUELLMAN, 1978).

Os nascimentos dos filhotes da jararaca da Amazônia ocorreram entre junho e janeiro (este estudo, OLIVEIRA, 2003), exceto no período mais chuvoso (FEC – fevereiro a abril). No entanto, em espécimes mantidos no sudeste do Brasil são observados nascimentos em cativeiro nos meses de fevereiro e março (FERNANDES et al., 1993), onde as condições ambientais (fotoperíodo, temperatura e umidade) são completamente diferentes da Amazônia brasileira. O período de nascimento no mês de janeiro em *B. atrox*, proveniente da Amazônia brasileira, somente foi reportado neste estudo pela observação de uma fêmea encontrada no final de janeiro com útero distendido e corpo albicans nos ovários. Tais características refletem uma recente parturição (MUNIZ-DA-SILVA, 2012).

A extensão e a falta de sincronia observada na prenhez das fêmeas de *B. atrox*, foram provavelmente influenciadas pelos fatores ambientais, como temperatura e pluviosidade. A prenhez pode ocorrer em qualquer período do ano, já que a temperatura é relativamente constante ao longo dos meses (sem inverno). Altas temperaturas proporcionariam um melhor desenvolvimento fetal, além de acelerar a embriogênese (HUBERT, 1985; HARTMANN; MARQUES; ALMEIDA-SANTOS, 2004). Já os nascimentos, somente, não foram observados no período com alta precipitação. Tal fato, provavelmente é devido aos alagamentos que ocorrem nesse período na região amazônica. Em dias de chuva as serpentes seriam forçadas a sair de seus abrigos para procurar locais secos (ABRAHÃO, 2007). A parturição pode ser restrita a períodos em que a ninhada encontrará condições ambientais mais favoráveis, não somente alimento (SAINT-GIRONS; PFEFFER, 1971; FITCH, 1982).

Assim, entre as espécies do gênero *Bothrops*, a jararaca da Amazônia, é a espécie que apresenta maior extensão e plasticidade no ciclo reprodutivo.

Dessa forma, é possível que fatores ambientais (e.g. temperatura e umidade) sejam muito importantes na determinação das épocas dos eventos do ciclo reprodutivo das fêmeas

da jararaca da Amazônia. Entretanto, a extensão do encontro de fêmeas prenhes e dos nascimentos em vários meses do ano, só foi possível devido à estocagem de espermatozoides, já que a vitelogênese e cópula são sazonais. Mas diferentemente das demais *Bothrops*, a estocagem em *B. atrox* não parece ser obrigatória, pois fêmeas foram encontradas prenhes no mesmo período da cópula, no início do desenvolvimento embrionário e nascimentos foram registrados poucos meses após a cópula: junho, julho e agosto (este estudo; OLIVERIRA, 2003). Além disso, neste estudo foi observada uma fêmea de *B. atrox*, apresentando apenas ovos com muito vitelo e um pequeno embrião visível no mês de outubro, cinco meses após a cópula.

Assim, as fêmeas de *B. atrox* prenhes no mesmo período da cópula, provavelmente estavam em estágios mais avançados da vitelogênese secundária, onde não precisariam estocar espermatozoides ou estocariam por um período mais curto. Já as fêmeas em vitelogênese primária ou no início da vitelogênese secundária, estocariam espermatozoides até adquirir energia suficiente para completar o ciclo vitelogênico (AUBRET et al., 2002; BONNET, 2011). Sabe-se que fêmeas do gênero *Bothrops* podem copular em vitelogênese primária (HARTMANN; MARQUES; ALMEIDA-SANTOS, 2004).

O ciclo reprodutivo dos machos das espécies do gênero *Bothrops* (*B. jararaca* e *B. erythromelas*, *B. leucurus* e *B. insularis*) é marcadamente sazonal. Apenas *B. leucurus* e *B. insularis* apresentam cópula associada à espermatogênese (ciclo associado) (KASPEROVICZUS, 2009; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014b). Entre os machos com ciclos dissociados, a estocagem de espermatozoides é obrigatória, para assegurar a cópula com a fêmea (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002).

Os machos de *B. atrox*, podem apresentar os dois tipos de ciclo reprodutivo (associado ou dissociado). Observamos que para alguns indivíduos a cópula coincide com o pico da espermatogênese. E em outros indivíduos os testículos encontram-se no início da regressão ou totalmente regredidos. Entretanto, não foi observada nenhuma variação no diâmetro dos ductos deferentes, ou seja, machos estocam espermatozoides ao longo do ano – como observado em outras espécies do gênero (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014b) e outras espécies de viperídeos, como a Cascavel neotropical (BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2013). Assim, o acasalamento pode ser independente da espermatogênese e os machos se adaptariam ao ciclo da fêmea (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002). Na espécie amazônica, *Oxybelis fulgidus* (Serpente: Colubridae) os machos também apresentam estocagem ao longo do ano,

sem variação no diâmetro dos ductos deferentes (SCARTOZZONI; SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2009).

Em *B. atrox*, os cortes histológicos mostraram túbulos seminíferos ativos ao longo do ano. Tal acontecimento não é encontrado nas demais *Bothrops*. Segundo Barros, Sueiro e Almeida-Santos (2012) altas temperaturas durante todo o ano permitem que a espermatogênese, ocorra em qualquer época do ano, diferentemente das espécies de regiões de clima frio. No entanto, apesar da extensa atividade testicular entre os indivíduos, o ciclo reprodutivo masculino da jararaca da Amazônia pode ser considerado sazonal semi-sincrônico (MATHIES, 2011), isso porque, o principal evento do ciclo, a espermiogênese, foi observada somente na estação chuvosa. Além disso, em serpentes as estratégias reprodutivas masculinas (e.g., espermatogênese e regressão testicular) podem exibir variação intraespecífica (SANTOS et al., 2005; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012).

A espermiogênese entre os espécimes de *B. atrox* foi associada à hipertrofia do SSR, na estação chuvosa, coincidindo também com o período de cópula no FEC. Essa variação do SSR em *B. atrox* foi observada somente pelas análises microscópicas e não pelas medições macroscópicas. Tal fato é comum em serpentes, pois o rim geralmente não varia muito em comprimento e diâmetro entre a fase ativa (acasalamento) e a fase de repouso (FOX, 1977; SEVER et al., 2007). Em *Bothrops erythromelas* a hipertrofia do SSR também foi diretamente relaciona com a espermiogênese (BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014b). A associação da hipertrofia dos túbulos contorcidos distais do rim (SSR) com a espermiogênese e cópula é comumente observada em machos de serpentes e lagartos, pois as células do SSR são andrógeno-dependentes e o aumento dos níveis de testosterona no sangue provoca uma hipertrofia nessa região tubular (FOX, 1977; SEVER; HOPKINS, 2005; ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2013). Na fase ativa do SSR (hipertrofia) são produzidos grânulos positivos principalmente para proteínas, lipídeos, fosfolipídeos e em menor grau para polissacarídeos (KUNHEL; KRISCH, 1974; SEVER; HOPKINS, 2005; SEVER et al., 2007). Devido a essas secreções produzidas, uma variedade de funções tem sido propostas, entre elas a de nutrição e ativação de espermatozoides no trato reprodutivo feminino (MARINHO et al., 2009; ALDRIDGE et al., 2011) e também a de formação do plug copulatório observado em serpentes Natricinae (FOX, 1977).

O ciclo reprodutivo dos machos de *B. atrox*, teve influência direta da temperatura e pluviosidade na determinação do ciclo, pois a quiescência testicular foi observada somente em alguns indivíduos no FEC e na maioria no IES. Sabe-se que a umidade é um fator determinante sobre o ciclo reprodutivo dos reptéis (FITCH, 1982). Em estudos com padrões

de atividade de *B. atrox* foi observada a dependência dos indivíduos pela chuva, a espécie está associada à umidade relativa e a pluviosidade, mas não a temperatura (OLIVEIRA; MARTINS, 2001; ABRAHÃO, 2007; FRAGA et al., 2013).

2.5 CONCLUSÕES

O habitat amazônico foi determinante no tipo de ciclo reprodutivo empregados por *Bothrops atrox*, a jararaca da Amazônia de ambos os sexos:

- A vitelogênese é sazonal inicia-se no início da estação chuvosa, estendendo até o início da estação seca;
- Foram encontrados espermatozoides no trato reprodutivo feminino em março e abril (final da estação chuvosa), indicando ser esta a época de acasalamento da espécie;
- O ciclo reprodutivo feminino não é definitivamente sazonal, pois a prenhez e nascimento dos filhotes não apresentam sincronia entre os indivíduos. E também não é definitivamente asazonal, isso porque, não foram encontrados nascimentos em todos os meses do ano, sendo assim, o ciclo da jararaca da Amazônia foi caracterizado como estendido;
- O ciclo reprodutivo masculino foi caracterizado como sazonal semi-sincrônico, pois apesar de serem encontrados indivíduos em todos os períodos do ano com atividade testicular, estes indivíduos apresentaram espermiogênese somente na estação chuvosa;
- A estocagem de espermatozoides nos machos ocorre ao longo do ano, sem variação no diâmetro dos ductos deferentes, podendo acasalar no período em que as fêmeas se encontram receptivas;
- Mudanças sazonais na hipertrofia do SSR de *B. atrox* estão associadas com a espermatogênese, estocagem de espermatozoides nas fêmeas e com o período de cópula.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, C. R. **Efeito de Riachos, chuva e disponibilidade de presas na ocorrência de *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae) em uma área de 25 KM² na Amazônia central.** 2007. 43 p. Dissertação (Mestrado) - Programa integrado de Pós-graduação em biologia tropical e recursos naturais do convênio INPA/UFAM. Manaus, 2007.
- ALDRIDGE, R. D. Female reproductive cycles of the snakes *Arizona elegans* and *Crotalis viridis*. **Herpetologica**, v. 35, p. 256-261, 1979.
- ALDRIDGE, R. D.; JELLEN, B. C.; SIEGEL, D. S.; WISNIEWSKI, S. S. The sexual segment of the kidney. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Florida: CRC Press, Boca Raton, 2011. v. 9, p. 477-509.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G. W.; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREEME, H. W. **Biology of the Vipers**. Eagle Mountain: Eagle Mountain publishing, 2002. p. 445-462.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; MARQUES, O. A. V.; PIZZATTO, L. Intra-sex synchrony and inter-sex coordination in reproduction of the coral snake *Micrurus corallinus* (Elapidae). **Herpetological Journal**, v. 16, p. 371-376, 2006.
- AUBRET, F.; BONNET, X.; SHINE, R.; LOURDAIS, O. Fat is sexy for females but not males: the influence of body reserves on reproduction in snakes (*Vipera aspis*). **Hormones and Behavior**, v. 42, p.135-47, 2002.
- BARBO, F. E.; GRAZZIOTIN, F. G.; SAZIMA, I.; MARTINS, M.; SAWAYA, R. J. A new and threatened insular species of lancehead from southeastern Brazil. **Herpetologica**, v. 68, p. 418-429, 2012.
- BARROS, V. A. **Biologia reprodutiva de três espécies de serpentes da Família Viperidae da região neotropical**. 2011. 97 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, 2011.
- BARROS, V. A.; SUEIRO, L. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of phylogenetic conservatism of reproductive patterns. **Herpetological Journal**, v. 22, p. 97-104, 2012.
- BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Is rainfall seasonality important for reproductive strategies in viviparous Neotropical pit vipers? A case study with *Bothrops leucurus* from the Brazilian Atlantic Forest. **Herpetological Journal**, v. 24, p. 69-77, 2014a.
- BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. **Advances in Zoology**, v. 2014, p. 01-11, 2014b.

BEEBE, W. Field notes on the snakes of Kartabo, British Guiana and Caripito, Venezuela. **Zoologica**, v. 31, p. 11-52, 1946.

BONNET, X. In the evolution of semelparity. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Enfield, New Hampshire: Science Publishers, 2011. p. 645-74.

BONFIGLIO, F. **Biologia reprodutiva e dieta de *Liophis semiaureus* (Serpentes—Colubridae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2007. 47 p. Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2007.

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

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. Ithaca: Cornell University Press, 2004. p. 870.

DIXON, J. R.; SOINI, P. **The reptiles of the upper Amazon Basin, Iquitos region, Peru**. Milwaukee: Milwaukee Public. Museum, 1986.

DUELLMAN, W. E. The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. **Miscellaneous publication**, University of Kansas, Museum of Natural History, v. 65, p. 1-352, 1978.

FERNANDES, W.; CARDOSO, S. R. T.; CHAVES, M. M. G.; MIYAJI, C. K.; SANT'ANNA, S. S.; LULA, L. A. B. M. Aspectos reprodutivos de *Bothrops atrox*: Período de cópula e dados sobre a ninhada. In: III **Congresso latino Americano de Herpetologia**, 3., 1993, Campinas.

FITCH, H. S. Reproductive cycles in tropical reptiles. **Occasional Papers of the Museum of Natural History University of Kansas**, v. 96, p. 1-53, 1982.

FRAGA, R.; MAGNUSSON, W. E.; ABRAHÃO, C. R.; SANAIOTTI, T.; LIMA, A. P. Habitat selection by *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae) in Central Amazonia, Brazil. **Copeia**, v. 4, p. 684-690, 2013.

FROTA, J. G. **Biologia reprodutiva e dieta de *Liophis jaegeri jaegeri* (Günther, 1858) (Serpentes, Colubridae, Xenodontinae)**. 2005. 52 p. Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2005.

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

GOLDBERG, S. R.; PARKER, W. S. Seasonal testicular histology of the colubrid snakes, *Masticophis taeniatus* and *Pituophis melanoleucus*. **Herpetologica**, v. 31, p. 317-322, 1975.

GOLDBERG, S. R. *Geophis hoffmanni* (Hoffmann's earth snake). Reproduction. **Herpetological Review**, v. 37, p. 351, 2006.

HARTMANN, M. T.; MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of the southern Brazilian pitviper *Bothrops neuwiedi pubescens* (Serpentes, Viperidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 25, p. 77-85, 2004.

HUBERT, J. Embryology of the squamata. In: GANS, C.; BILLET, F. **Biology of the reptilia**. New York: Wiley and Sons, 1985. v. 15, p. 1-55.

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

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

KASPEROVICZUS, K. N. **Biologia reprodutiva da jararaca Ilhoa, *Bothrops insularis*, (Serpentes: Viperidae) da Ilha da Queimada Grande, São Paulo**. 2009. 126 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

KASPEROVICZUS, K. N. **Evolução das estratégias reprodutivas de *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. 2013. 135 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

KING, R. B. Body size variation among island and mainland snake populations. **Herpetologica**, v. 45, p. 84-8, 1989.

KROMER, R. W.; MARTINEZ, D.; MASON, R. T. Development of the renal sexual segment in immature snakes: effect of sex steroid hormones. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 139, p. 55-64, 2004.

KUHNEL, W.; KRISCH, B. On the sexual segment of the kidney in the snake (*Natrix natrix*). **Cell Tissue Res**, v. 148, p. 417– 429, 1974.

LUTTERSCHMIDT, D. I.; MASON, R. T. Endocrine mechanisms mediating temperature-induced reproductive behavior in red-sided garter snakes (*Thamnophis sirtalis parietalis*). **Journal of Experimental Biology**, v. 212, p. 3108-3118, 2009.

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

MARQUES, O. A. V.; SAWAYA, R. J.; STENDER-OLIVEIRA, F.; FRANÇA, F. G. R. Ecology of the colubrid snake *Pseudablabes agassizii* in south-eastern South America. **Herpetological Journal**, v. 16, p. 37-45, 2006.

MARTINS, M.; ARAÚJO, M. S.; SAWAYA, R. J.; NUNES, R. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of neotropical pitvipers (*Bothrops*). **Journal of Zoology**, v. 254, p. 529-38, 2001.

- MATHIES, T. Reproductive cycles of tropical snakes. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. (Ed.). **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. New Hampshire: Science Publishers, Enfield, 2011. v. 1, p. 511-550.
- MCPHERSON, R. J.; MARION, K. R. Seasonal testicular cycle of the stinkpot turtle (*Sternotherus odoratus*) in Central Alabama. **Herpetologica**, v. 37, p. 33-40, 1981.
- MONTEIRO, C.; MONTEGOMERY, C. E.; SPINA, F.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Feeding, reproduction, and morphology of *Bothrops matogrossensis* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) in the Brazilian Pantanal. **Journal of Herpetology**, v. 40, n. 3, p. 408-413, 2006.
- MUNIZ-DA-SILVA, D. F. **Ciclo reprodutivo da caninana, *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Colubridae)**. 2012. 137 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.
- NOGUEIRA, C.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 37, p. 653–659, 2003.
- NUNES, S. F.; KAEFER, I. L.; LEITE, P. T.; CEOHIN, S. Z. Reproductive and feeding biology of the pitviper *Rhinocerocephalus alternatus* from subtropical Brazil. **Herpetological Journal**, v. 20, p. 31-39, 2010.
- OLIVEIRA, M. E.; MARTINS, M. When and where to find a pitviper: activity patterns and habitat use of the lancehead, *Bothrops atrox*, in central Amazonia, Brazil. **Herpetological Natural History**, v. 8, n. 2, p. 101-110, 2001.
- OLIVEIRA, M. E. **História natural de jararacas brasileiras do grupo *Bothrops atrox* (serpentes: Viperidae)**. 2003. 131 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade do Estado de São Paulo. Rio Claro, 2003.
- PIZZATTO, L.; MARQUES, O. A. V. Reproductive ecology of *Boine* snakes with emphasis on Brazilian species and comparison to phytons. **South American Journal of Herpetology**, v. 2, p. 107-122, 2007.
- RASBAND, W. **ImageJ 1.46r**. National institute of health, USA, 2011. Disponível em: < <http://imagej.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 05 jan. 2015.
- ROJAS, C. A.; BARROS, V. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. The reproductive cycle of the male sleep snake *Sibynomorphus mikanii* (Schlegel 1837) from southeastern Brazil. **Journal of Morphology**, v. 274, n. 2, p. 215-228, 2013.
- SAINT -GIRONS, H. S.; PFEFFER P. Le cycle sexuel des serpents du Cambodge. **Annales des Sciences Naturelles, Zoologie**, v. 13, p. 543-572, 1971.
- SAINT-GIRONS, H. S. Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycles. **Herpetologica**, v. 38, p. 5-16, 1982.
- SANTOS, X.; LLORENTE, G. A.; FERICHE, M.; PLEGUEZUELOS, J. M. Food availability induces geographic variation in reproductive timing of an aquatic oviparous snake (*Natrix maura*). **Amphibia-Reptilia**, v. 26, p. 183–191, 2005.

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

SASA, M.; WASKO, D. K.; LAMAR, W. W. Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. **Toxicon**, v. 54, p. 904-922, 2009.

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

SEIGEL, R. A.; FORD, N. B. Reproductive Ecology. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S. **Snakes: Ecology and Evolutionary Biology**. New York: MacGraw-Hill Publishing Company, 1987, p. 210-243.

SEVER, D. M.; STEVENS, R. A.; RYAN, T. J.; HAMLETT, W. C. Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). III. Sexual segment of the male kidney. **Journal of Morphology**, v. 252, p. 238-254, 2002.

SEVER, D. M.; HOPKINS, W. A. Renal Sexual Segment of the Ground Skink, *Scincella laterale* (Reptilia, Squamata, Scincidae). **Journal of Morphology**, v. 266, p. 46-59, 2005.

SEVER D. M.; SIEGEL S. D.; BAGWILL A.; ECKSTUT E. M.; ALEXANDER L.; CAMUS A.; MORGAN C. Renal sexual segment of the cottonmouth snake *Agkistrodon piscivorus* (Reptilia, Squamata, Viperidae). **Journal of Morphology**, v. 1, p.1-14, 2007.

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

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

SHINE, R. Sexual dimorphism in snakes. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T. **Snakes: ecology and behaviour**. New York: McGraw-Hill and Co, 1993. p. 49-86.

SHINE, R. Sexual dimorphism in snakes revisited. **Copeia**, v. 1994, p. 326-46, 1994.

SHINE, R. Reproductive strategies in snakes. **Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences**, v. 270, p. 995-1004, 2003.

SHINE, R.; BONNET, X. Reproductive biology, population viability, and options for field management; pp. 172-200. In: MULLIN, S. J.; SEIGEL, R. A. (Ed.). **Snakes – ecology and conservation**. Ithaca: Cornell University Press, 2009.

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

VITT, L. J.; VANGILDER, L. D. Ecology of a snake community in northeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 4, p. 273-296, 1983.

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

APÊNDICE

APÊNDICE A – Identificação dos exemplares analisados de *B. atrox*

INPA – Coleção Herpetológica de Anfíbios e Répteis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - 31484, 11906, 25886, 28796, 30292, 31509, 31514, 31508, 14736, 18070, 28797, 28590, 9689, 31517, 31551, 31487, 1235, 31486, 31516, 20375, 31490, 19808, 31551, 9688, 31510, 31511, 1145, 31487, 1235, 31491, 31486, 31515, 10933, 20375.

LPZ – Laboratório de Pesquisas Zoológicas das Faculdades Integradas do Tapajós - 1530, 1729, 2585, 5556, 1283, 5554, 1728, 1674, 1920, 5557, 4898, 3319, 3170, 1117, 2680, 1084, 1251, 3597, 5503, 2808, 2236, 2224, 3796, 1112, 2684, 2760, 3679, 5627, 5628, 5142, 5600, 5636, 5635, 5787, 5783, 2655, HMC 263, 4298, HMC 27, HMC 78. 2583, 4302, 980, 1789, 2763, 5558, 401, 2729, 5550, 5551, 1223, 1793, 3633, 4517, 2766, 3642, 2815, 2531, 1033, 2309, 5777, 5776, 289, 5549, HMC 195, HMC 281, HMC 60, HMC 176, HMC 26, HMC 193, HMC 42, 4225, HMC 188, HMC 141, 5549, 5615, 970, 1208, 1265, 1207, 1424, 1336, 5555, 5501, 3027, 5504, 4900, 1984, 2691, 5568, 5502, 1651, 1498, 2665, 2666, 2222, 2821, 1306, 1305, 1921, 1643, 3600, 3313, 2838, 5634, 4906, 4903, 5637, 5742, 4839, 576, 396, HMC 66, HMC 180, HMC 283, HMC 84, HMC 62, HMC 157, HMC 65, HMC 108, HMC 106, HMC 124, HMC 261, HMC 57, HMC 55, HMC 282, HMC 138, HMC 7.

MNRJ – Coleção do Museu Nacional do Rio de Janeiro - 16822, 15008, 958, 3003, 967, 3411, 16824, 17965, 17966, 14244, 16825, 16821, 15003, 23280, 3002, 8415, 974, 8577, 16823, 16070, 16505, 23217, 20294, 17952, 349, 20663, 16510, 19833, 16820, 18950, 16098, 18945, 18944, 8301, 959, 963, 960, 9015, 2990, 10049, 8576, 10835, 3031, 3016, 3015, 3407, 8300, 3409, 1294, 2764, 2765, 17967.

PUC/RS – Coleção do Museu de Ciências e Tecnologia - 8896, 7922, 8898, 6369, 14576, 11326, 8909, 7625, 14578, 7921.

UFAC – Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Acre - 16, 255, 336, 168, 30235, 36, 39, 351, 32, 350, 169, 353, 207, 209, 55, 52, 125, 117, 14, 38, 116, 17, 81, 337, 4, 34, 33, 53.

UFMT – Coleção de Vertebrados do Mato Grosso - 7223, 7228, 6220, 7778, 8232, 8907, 8915, 8581, 7704, 7204, 8570, 8577, 8547, 8160, 8444, 5718, 7774, 8550, 6424, 6812, 8924, 8580, 8899.

CRHRO – Coleção de Referência da Herpetofauna de Rondônia - 165, 2569, 284, 19873, 151, 155, 159, 2573, 163, 1304, 154, 161, 167, 164, 148, 8499, 169, 153, 158, 162, 156, 152, 160, 157, 2575, 466, 2018, 168, 2572.

ZUEC – Coleção de Répteis do Museu de Zoologia da Unicamp - 1635, 1633, 169, 1974, 2045, 1604.

ANEXO

ANEXO A – Artigo submetido na revista Salamandra

Sexual dimorphism in neonates of the Amazonian lancehead, *Bothrops atrox*

Karina M. P. Silva^{1,2,3}, Karina N. Kasperoviczus¹, Henrique B. Braz¹ & Selma M. Almeida-Santos^{1,2}

¹ Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, Brazil

² Departamento de Anatomia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-270, São Paulo, Brazil

³ Corresponding author: karina.silva@butantan.gov.br

Running head: Sexual dimorphism in neonate lanceheads

Abstract. Sexual dimorphism is widespread in snakes and can take many forms. However, while most studies focus on adult snakes, sex differences in neonates remain largely unidentified. Here, we examined 66 preserved neonates (43 males and 23 females) of the Amazonian lancehead (*B. atrox*), which were collected throughout most of its distribution, to verify the existence of sexual dimorphism at birth in body measurements and coloration (tail tip and chins). Among the morphological traits examined, sexes differed only in relative tail length, with males having longer tails than females. We also found that neonates of *B. atrox* were sexually dimorphic in both traits examined. The tail tip of males was pale (varying from yellowish to light brown and sharply contrasting with the dorsal pattern), whereas the coloration of the tail tip of females was generally similar to the dorsal coloration (varying from brownish to black). Moreover, we found that the chins of males had distinct dark markings, whereas chins of females had lighter markings. Sexual dichromatism is present throughout the species' distribution, and can be used as a tool to distinguish male from female neonate. Examination sexual dichromatism in tail tip of *Bothrops* spp. suggests that such

variation has evolved only in the '*B. atrox* complex', and that females have lost the pale tail tip. It is unclear if caudal luring behaviour differs between sexes (as a consequence of the differences in tail tip coloration), and if there is any selective advantage in showing sexual dichromatism in tail tip colour.

Key words. Viperidae, caudal luring, sexual dichromatism.

Introduction

Sexual dimorphism is widespread among animals and can take a huge variety of forms (e.g., Owens & Hartley 1998; Vitt & Caldwell 2014). In snakes, sex differences may occur in several morphological, ecological, and behavioural traits (Shine 1993). Among them, sex differences in morphological traits are certainly one of the most studied forms of sexual dimorphism in snakes. Conspecific males and females may differ in body size, body shape, scalation, and internal anatomy (Shine 1993). Nevertheless, the degree and direction of sexual size dimorphism vary among species. While in many species, adult females are larger than males (e.g., Nogueira et al. 2003; Braz et al. 2014), in others, adult males are larger than females (e.g., Marques et al. 2013a; Nascimento et al. 2013). These differences are often explained by sexual, natural, and fecundity selection (Andersson 1994). Another form of dimorphism is related to intersexual differences in coloration (sexual dichromatism), which have also been reported for several snake species (Shine 1993). For example, males of some viper species tend to be brighter coloured and have more strongly contrasting dorsal zigzag lines than females (Shine & Madsen 1994).

Although sexual dimorphism is widely reported in adult snakes, its occurrence in neonates has been poorly investigated (Shine 1993). Nonetheless, a number of recent studies have shown that at least sexual size dimorphism at birth (or hatching) also occurs in different traits of several species (e.g., King et al. 1999; Santos-Jr & Ribeiro 2005; Krause & Burghardt 2007). Conversely, sexual dichromatism in neonate snakes has been rarely investigated.

The genus *Bothrops* provides opportunities to investigate the occurrence of sexual dimorphism at birth. Species of *Bothrops* are widely distributed in the Neotropical region, and rather diverse in phylogenetic and ecological terms (Martins et al. 2001, 2002; Campbell & Lamar 2004; Fenwick et al. 2009). Sexual dimorphism in body size and body shape is common in the genus, with females usually longer, and with larger heads than males (e.g., Solórzano & Cerdas 1989; Nogueira et al. 2003; Barbo et al. 2012; Marques et al. 2013b). However, it is unclear whether these differences already exist at birth or develop during

ontogeny (see King et al. 1999; Tomović et al. 2010). In turn, sexual dichromatism at birth has been reported in some species of *Bothrops*. For instance, male and female neonates of the terciopelo *Bothrops asper* and of the whitetail lancehead *B. leucurus* vary in tail tip coloration. In both species, neonate males have pale (yellowish, whitish) tail tips, whereas females lack the pale tail tip (Burger & Smith 1950; Solórzano & Cerdas 1989; Lira-da-Silva et al. 1994; Lira-da-Silva 2009). The same dichromatism was also reported in the Amazonian lancehead *B. atrox* (Hoge & Federsoni 1976/77). Nevertheless, such dichromatism in *B. atrox* was described for only one litter from a female collected in Peru (Hoge & Federsoni 1976/77). Because some phenotypic traits may exhibit strong family effects (King et al. 1999) and vary geographically (Pearson et al. 2002), sexual dichromatism in tail tip colour of *B. atrox* neonates needs to be properly confirmed (Campbell & Lamar 2004; Martins et al. 2002). Another trait that shows sexual dichromatism in *Bothrops* is the coloration of the chin. In male neonates of *B. jararacussu*, chins have distinct dark grey markings, whereas female neonates have less pronounced and lighter markings (Marques & Sazima 2003). However, sexual dichromatism in this trait has been observed only in this species. Marques & Sazima (2003) argue that sexual dichromatism in neonates may be more widespread than previously known because such dimorphism may be misinterpreted as individual colour variation.

In this paper, we used preserved museum specimens to evaluate the existence of sexual dimorphism in neonates of the Amazonian lancehead *B. atrox* throughout most of its distribution. Specifically, we investigated whether male and female neonates are different in (1) body measurements (body size and body shape) and (2) coloration (tail tips and chins). Additionally, we explore the evolution and possible ecological significance of sexual dimorphism at birth in the '*B. atrox* group'.

Material and methods

Because tail tip coloration changes during ontogeny and in different times between sexes (Leloup 1975; Hoge & Federsoni 1976/77), we used only information from neonates. We considered as neonates specimens with snout-vent length (SVL) below 300 mm (Hoge & Federsoni 1976/77; Oliveira 2003). According to this criterion, we examined 66 preserved specimens (43 males and 23 females) housed in the following scientific collections: Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Acre (UFAC); Laboratório de Pesquisas Zoológicas das Faculdades Integradas do Tapajós, Pará (LPZ); Coleção Herpetológica de Anfíbios e Répteis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA); Coleção de Referência da Herpetofauna de Rondônia (CRHRO); Museu de História Natural da

Universidade Estadual de Campinas (ZUEC); Coleção de Vertebrados, Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT); Museu Nacional, Rio de Janeiro (MNRJ); and Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). The specimens examined belong to different populations of the Amazon, and were collected in Colombia and in several states of Brazil (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Mato Grosso, and Tocantins).

For each specimen, we first measured SVL, tail length, and head length. Sex was determined by direct examination of the gonads (after a mid-ventral incision) and the presence/absence of hemipenis (after an incision in the ventral portion of the tail). After that, we recorded the tail tip and chin coloration. We used a *t*-test to examine intersexual differences in mean neonate SVL. Preliminary analyses showed that SVL was correlated with both tail length ($r = 0.74$; $P < 0.0001$) and head length ($r = 0.60$; $P < 0.0001$). Therefore, we tested for sexual dimorphism in these traits using ANCOVA, with SVL as the covariate.

Results

Mean SVL did not differ between sexes ($t = 0.64$; $df = 64$; $P = 0.53$). Mean SVL of neonate males was 255.9 ± 34.4 mm (range: 155-295 mm; $n = 43$), whereas mean SVL of neonate females measured 250.8 ± 23.4 mm (range: 207-293 mm; $n = 23$). Relative head length was also similar between sexes (ANCOVA, slopes: $F_{1,62} = 0.69$; $P = 0.410$; sex: $F_{1,63} = 1.00$; $P = 0.320$; Fig. 1A). However, we found sexual dimorphism in relative tail length. Neonate males had relatively longer tails than females (ANCOVA, slopes: $F_{1,62} = 1.72$; $P = 0.195$; sex: $F_{1,63} = 6.76$; $P = 0.012$; Fig. 1B). The tail corresponds to 13.7-21.3% (mean = $18.0 \pm 1.8\%$) of SVL in males and 14.4-20.4% (mean = $16.9 \pm 1.5\%$) in females.

All neonate males had paler tail tips than females. The tail tip coloration in males varied from yellowish to light brown, and sharply contrasts with the dorsal pattern (Fig. 2). In contrast, the tail tip coloration in females was in general similar to the dorsal coloration pattern, and varied from brownish to black (Fig. 2). In addition, we found that the male chins have distinct dark markings, whereas in females these markings are lighter (Fig. 3).

Figure 1. Intersexual comparisons of body shape in *B. atrox* neonates. (A) Relative head length and (B) Relative tail length. Relative head length and relative mass are residual scores from the general linear regressions of log-transformed head length and tail length against SVL, respectively. In each box plot, the lower and upper bounds represent the standard deviation, the middle is the mean, and whiskers represent minimum and maximum values. * Significant difference, $P < 0.05$.

Figure 2. Sexual dichromatism in tail tip coloration of *B. atrox* neonates. Note that neonate males (right side) have paler tail tips than neonate females (left side).

Figure 3. Sexual dichromatism in chins of *B. atrox* neonates. Note that the male chins have distinct dark markings, whereas in females these markings are lighter.

Discussion

Our results confirm that tail tip coloration is a sexually dimorphic trait in *B. atrox*, extending such occurrence to other areas beyond Peruvian populations (Hoge & Federsoni 1976/77). Moreover, we report here for the first time the sexual dichromatism in the chins in a species of the '*B. atrox* group'. Regarding body size and shape, we found sexual dimorphism only in relative tail length, with males having relatively longer tails.

Sex differences in body size have been reported for a number of neonate snake species (Richmond 1954; King et al. 1999; Santos-Jr & Ribeiro 2005) but seem not to occur in neonates of the genus *Bothrops* (e.g., *B. jararaca*: Furtado et al. 2006; *B. moojeni*: Leloup 1975). Adult females of *Bothrops* spp. are usually longer and have larger heads than males (e.g., Solórzano & Cerdas 1989; Nogueira et al. 2003; Barbo et al. 2012; Marques et al. 2013), indicating that such dimorphism develops during ontogeny, probably due to different growth trajectories (see Furtado et al. 2006). We found that the tail is longer in neonate males than in females, which has also been observed in neonates of species of the *B. neuwiedi* complex (Xavier 2002), and in adult snakes, including the genus *Bothrops* (Valdujo et al. 2002; Nogueira et al. 2003). Although the exact cause of the evolution of longer tails in males remains unclear (Shine et al. 1999), this finding is often related to the need to accommodate hemipenes and retractor muscles present in males (King 1989).

In several types of studies, sex determination of among individuals is an important procedure. For adult snakes, distinguishing between male and female snakes is a relatively simple task. In live adult or sub adult snakes, sexing can be done by inserting a blunt probe into the tail (Schaefer 1934; Fitch 1987) or by exerting a gentle pressure on the base of the tail, everting hemipenis in males (Fitch 1987). Moreover, the sex of live and preserved specimens can be determined by examining the shape of the tail base, which is thicker in males (Shine 1991). However, using these methods in neonate snakes may be more difficult because they are more fragile and much smaller than adults, which can make the differences in tail thickness less noticeable. Obviously, sex of preserved specimens can also be determined by examination of gonads (as performed here). Nonetheless, dissection of specimens may depend on collections management policies. We suggest that the sexual dichromatism in tail tip and chin coloration found here can be used as a tool to determine sex of both live and preserved neonate *B. atrox* (at least for the populations examined).

In *Bothrops*, sexual dichromatism in tail tip was observed only in neonates of the species belonging to the '*B. atrox* complex': *B. atrox* (this study), *B. asper* (Burger & Smith 1950; Solórzano & Cerdas 1989), and *B. leucurus* (Lira-da-Silva et al. 1994; Lira-da-Silva

2009). Neonate males of all these species have in common the tail tip paler than the rest of the body, whereas tail tip coloration in females is similar to the body coloration (Burger & Smith 1950; Solórzano & Cerdas 1989; Lira-da-Silva et al. 1994; Lira-da-Silva 2009). However, pale tail tip seemingly occur in all neonates of *B. moojeni* (Leloup 1975), another representative of the group. The '*B. atrox* complex' is consistently recovered as the sister group of the '*B. jararacussu* complex', both in molecular and morphological phylogenetic hypotheses (Fenwick et al. 2009; Carrasco et al. 2012). The colour of the tail tip in *B. jararacussu* is always pale and distinct from the body in both sexes (Marques & Sazima 2003). In addition, the tail tip in juvenile *B. taeniata* and *B. bilineata* is reported to be always distinct (Martins et al. 2002), the sister group of '*jararacussu* + *atrox*' groups (Fenwick et al. 2009; Carrasco et al. 2012). This indicates that female coloration has changed rather than the male coloration through *Bothrops* phylogeny. A number of *Bothrops* species belonging to other groups are reported to show variation in tail tip colour, with juveniles having both distinct and indistinct tail tip (e.g., *B. alcatraz*, *B. erythromelas*, *B. cotiara*, *B. fonscai*; Martins et al. 2002). However, it is unknown if such variation is gender related, as observed in the '*B. atrox* group'. Moreover, because tail tip colour changes ontogenetically (Leloup 1975; Hoge & Federsoni 1976/77), it is possible that the variation observed in the species above is an artefact of including juvenile individuals (which may have lost the pale tail tip) in the sample, instead of only neonate specimens. A full analysis involving only neonates of the *Bothrops* species that present variation in tail tip colour is needed to test whether such variation is always gender related or evolved only in the species of the '*B. atrox* group'.

But why has the lack of a distinct tail tip evolved in neonate females of some species of the '*B. atrox* group'? A distinct tail tip in snakes is often related to the behaviour known as caudal luring (Neill 1960; Heatwole & Davidson 1976; Greene 1992; Martins et al. 2002). This behaviour is widespread among several snake species and is characterized by movements of the tail, which mimic an insect larvae or other invertebrates, particularly to attract ectothermic and insectivorous prey (Neill 1960; Heatwole & Davidson 1976; Greene 1992). Caudal luring is reported in juveniles of several species of *Bothrops* (Burger & Smith 1950; Neill 1960; Tryon 1985; Sazima 1991; Greene 1992; Martins et al. 2002; Andrade et al. 2010). In *Bothrops*, an ontogenetic shift in diet occurs in most species. Juveniles of species which have a distinct tail tip feed mainly on ectothermic preys, whereas adults, which usually lose the pale tail tip feed mostly on endothermic preys (Martins et al. 2002). Therefore, it is reasonable to suggest that male and female neonates of *B. atrox* have different dietary habits and caudal luring behaviour. However, this is a hypothesis difficult to evaluate with the

available information. Although the food habits of *B. atrox* are relatively well-known, intersexual divergence in neonates of *B. atrox* has not been described (e.g., Duellman 1978; Dixon & Soini 1986; Martins & Gordo 1993; Martins & Oliveira 1998; Martins et al. 2002; Bernarde & Abe 2010). Nevertheless, caudal luring is reported to occur in two species showing variation in tail tip colour. For example, Tryon (1985) reported that both male (pale tail tip) and female (indistinct tail tip) *B. asper* neonates perform caudal luring when prey are present. In addition, *B. jararaca* juveniles with or without pale tail tips are known to perform caudal luring (Sazima 1991). Therefore, it is likely that *B. atrox* neonates and juveniles of both sexes perform caudal luring. A possible consequence of sexual dichromatism in the tail tip is an increase in the effectiveness of caudal luring in males (Shine 1993). Experimental manipulation of tail colour, using the rattlesnake *Sistrurus miliarius* as model, indicated that foraging success is not affected by tail colour (Farrell et al. 2011). However, intersexual dietary differences among snakes are often associated with sexual dimorphism in body size or body shape (Shine 1991, 1993; Vincent et al. 2004). The lack of dimorphism in body and head shape found here suggests that such differences may not occur in *B. atrox*.

The scenario for the evolution of sexual dichromatism in the chin is a little more complicated to be evaluated. This occurs because, to date, such variation is confirmed only for *B. atrox* (this study) and *B. jararacussu* (Marques & Sazima 2003). Sexual dichromatism in the chin seemingly occur in *B. moojeni* (Leloup 1975); a member of the '*B. atrox* complex'. However, this report needs to be adequately demonstrated. A more detailed analysis can be carried out to show whether such variation evolved independently in these two species is restricted to the '*atrox + jararacussu*' clade or is more widespread than currently known.

Acknowledgements

We thank M.B. de Souza, H.M. Chalkidis, P.R. Manzani, R. Fernandes, P. Passos, R. Vogt, F.F. Curcio, M.R. Messias, H. Zaher, and L. Chagas for allowing access to specimens under their care, V.J. Germano, I. Marialva, and P.H.S. Ganança for valuable assistance in the laboratory. We also thank A. Fonseca for English revision and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the fellowship provided to K.M.P Silva.

References

- Andersson, M. (1994): Sexual Selection. – Princeton University Press, Princeton, 624 pp.
- Andrade, D. V., O. A. V. Marques, R. S. B. Gavira, F. E. Barbo, R. L. Zacariotti & I. Sazima (2010): Tail luring by the golden lancehead (*Bothrops insularis*), an island endemic snake from South-Eastern Brazil. – South American Journal of Herpetology, **5**: 175-180.
- Barbo, F. E., F. G. Grazziotin, I. Sazima, M. Martins & R. J. Sawaya (2012): A new and threatened insular species of lancehead from southeastern Brazil. – Herpetologica, **68**: 418-429.
- Bernarde, P. S. & A.S. Abe (2010): Hábitos alimentares de serpentes em Espigão do Oeste, Rondônia, Brasil. – Biota Neotropica, **10**: 167-173.
- Braz, H. B., K. N. Kasperoviczus & S. M. Almeida-Santos (2014). Reproductive ecology and diet of the fossorial snake *Phalotris lativittatus* in the Brazilian Cerrado. – Herpetological Journal, **24**: 49-57.
- Burger, W. L. & P. W. Smith (1950): The coloration of the tail tip of young fer-de-lance: Sexual dimorphism rather than adaptive coloration. – Science, **112**: 431-433.
- Campbell, J. A. & W. Lamar (2004): The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. – Cornell University Press, Ithaca, 870 pp.
- Carrasco, P. A., C. I. Mattoni, G. C. Leynaud & G. J. Scrocchi (2012): Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). – Zoologica Scripta, **41**: 109-124.
- Dixon, J. R. & P. Soini (1986): The reptiles of the upper Amazon basin, Iquitos region, Peru. – Milwaukee Public Museum, Milwaukee, 154 pp.
- Duellman, W. E. (1978): The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. University of Kansas Museum of Natural History, Miscellaneous Publication, **65**: 1-352.

Farrell, T. M., P. G. May & P. T. Andreadis (2011): Experimental manipulation of tail color does not affect foraging success in a caudal luring rattlesnake. – *Journal of Herpetology*, **45**: 291-293.

Fenwick, A. M., R. L. Gutberlet JR, J. A. Evans & C. L. Parkinson (2009): Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). – *Zoological Journal of the Linnean Society*, **156**: 617-640.

Fitch, H. S. (1987): Collecting and life-history techniques. – pp. 143–164 in: Seigel, R. A., J. T. Collins & S. S. Novak (eds): *Snakes - Ecology and Evolutionary Biology*. – MacMillan Publishing Company, New York.

Furtado, M. F. D., S. R. Travaglia-Cardoso & M. M. T. Rocha (2006): Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). – *Toxicon*, **48**: 401-410.

Greene, H. W. (1992): The ecological and behavioral context of pitviper evolution. – pp. 107–117 in: Campbell, J. A. & E. D. Brodie (eds): *Biology of the Pitvipers*. – Selva, Tyler.

Heatwole, H. & E. Davison (1976): A review of caudal luring in snakes with notes on its occurrence in the Saharan sand viper, *Cerastes vipera*. – *Herpetologica*, **3**: 332-336.

Hoge, A. R. & P. A. Federsoni (1976/77): Observações sobre uma ninhada de *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) Serpentes: Viperidae. – *Memórias do Instituto Butantan*, **40/41**: 19-36.

King, R. (1989): Sexual dimorphism in snakes tail length: sexual selection, natural selection, or morphological constraint? – *Biological Journal of Linnean Society*, **38**:133-154.

King, R. B., T. D. Bittner, A. Queral-Regil, J. H. Cline (1999): Sexual dimorphism in neonate and adult snakes. – *Journal of Zoology*, **247**: 19-28.

Krause, M. A. & G. M. Burghardt (2007): Sexual dimorphism of body and relative head sizes in neonatal common garter snakes (*Thamnophis sirtalis*). – *Journal of Zoology*, **272**, 156-164.

Leloup, P. (1975): Observations sur la reproduction de *Bothrops moojeni* Hoge en captivité. – Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia, **62**: 173-201.

Lira-da-Silva, R. J. (2009): *Bothrops leucurus* Wagler, 1824 (Serpentes; Viperidae): Natural history, venom and envenomation. – Gazeta Médica da Bahia, **79**: 56-65.

Lira-da-Silva, R. J., L. L. Casais-e-Silva, I. B. Queiroz & T. B. Nunes (1994): Contribuição à biologia de serpentes da Bahia, Brasil. I. Vivíparas. – Revista Brasileira de Zoologia, **11**: 187-193.

Marques, O. A. V. & I. Sazima (2003): *Bothrops jararacussu* (Jararacussu). Sexual dichromatism. – Herpetological Review, **34**: 62.

Marques, O. A. V., L. Pizzatto & S. M. Almeida-Santos (2013a): Reproductive strategies of new world coral snakes, genus *Micrurus*. – Herpetologica, **69**: 58-66.

Marques, O. A. V., K. Kasperoviczus & S. M. Almeida-Santos (2013b): Reproductive Ecology of the Threatened Pitviper *Bothrops insularis* from Queimada Grande Island, Southeast Brazil. – Journal of Herpetology, **47**: 393–399.

Martins, M. & M. Gordo (1993): *Bothrops atrox* (Common Lancehead). Diet. – Herpetological Review, **24**: 151-152.

Martins, M. & M. E. Oliveira (1998): Natural history of snakes in forests of the Manaus Region, Central Amazonia, Brazil. – Herpetology Natural History, **6**: 78-150.

Martins, M., M. S. Araujo, R. J. Sawaya & R. Nunes (2001): Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of Neotropical pitvipers (*Bothrops*). – Journal of Zoology, **254**: 529-538.

Martins, M., O. A. V. Marques & I. Sazima (2002): Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. – pp. 307-328 in: Schuett, G. W., M. Höggren, M. E. Douglas & H.W. Greene (eds): Biology of the Pitvipers. – Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain.

Nascimento, L. P., D. M. Siqueira & M. C. Santos-Costa (2013): Diet, reproduction, and sexual dimorphism in the vine snake, *Chironius fuscus* (Serpentes: Colubridae), from Brazilian Amazonia. – South American Journal of Herpetology, **8**: 168-174.

Neill, W. T. (1960): The caudal lure of various juvenile snakes. – The Quarterly Journal of the Florida Academy of Sciences, **23**: 173-200.

Nogueira, C., R. J. Sawaya & M. Martins (2003): Ecology of *Bothrops moojeni* (serpentes: Viperidae: Crotalinae) in the Brazilian Cerrado. – Journal of Herpetology, **37**: 653-659.

Oliveira, M. E. (2003): História natural de jararacas brasileiras do grupo *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae). – Unpubl. PhD thesis.

Owens, I. P. F. & I. R. Hartley (1998): Sexual dimorphism in birds: why are there so many different forms of dimorphism? – Proceedings of the Royal Society of London B, **265**: 397-407.

Pearson, D., R. Shine & A. Williams (2002): Geographic variation in sexual size dimorphism within a single snake species (*Morelia spilota*, Pythonidae). – Oecologia **131**: 418–426.

Richmond, N. D. (1954): Variation and sexual dimorphism in hatchlings of the rainbow snake, *Abastor erythrogrammus*. – Copeia, **1954**: 87-92.

Santos-JR, A. P. & F. R. V. Ribeiro (2005): Dimorfismo sexual em uma prole da cobra d'água *Helicops polylepis* Günther, 1861 (Serpentes, Colubridae) do oeste do Estado do Pará, Brasil, com comentários sobre o período reprodutivo. – Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia, PUCRS, **18**: 67-71.

Sazima, I. (1991): Caudal luring in two Neotropical pitvipers, *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu*. – Copeia, **1991**: 245-248.

Schaefer, W. H. (1934): Diagnosis of sex in snakes. Copeia, **1934**: 181.

Shine, R. (1991): Australian Snakes: A Natural History. Sydney: A. H. & A. W. Reed.

Shine, R. (1993): Sexual dimorphism in snakes. – pp. 49-86 in: Seigel, R. A. & J. T. Collins (eds): Snakes - Ecology and Behaviour. – McGraw-Hill and Co, New York.

Shine, R. & T. Madsen (1994): Sexual dichromatism in snakes of the genus *Vipera*: A review and a new evolutionary hypothesis. – Journal of Herpetology, **28**: 114-117.

Shine, R., M. M. Olsson, I. T. Moore, M. P. Lemaster & R. T. Mason (1999): Why do male snakes have longer tails than females? – Proceedings of the Royal Society London, **266**: 2147-2151.

Solórzano, A. & L. Cerdas (1989): Reproductive biology and distribution of the terciopelo, *Bothrops asper* Garman (Serpentes: Viperidae), in Costa Rica. – Herpetologica, **45**: 444-450.

Tomović, L. M., J. M. Crnobrnja-Isailović, R. D. Ajtić, I. D. Aleksić & S. Z. Djordjević (2010): When do meadow vipers (*Vipera ursinii*) become sexually dimorphic? – ontogenetic patterns of sexual size dimorphism. – Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, **48**: 279-282.

Tryon, B. W. (1985): *Bothrops asper* (terciopelo). Caudal luring. – Herpetological, **16**: 28.

Valdujo, P. H., C. C. Nogueira & M. Martins (2002): Ecology of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) in the Brazilian Cerrado. – Journal of Herpetology, **36**: 169-176.

Vincent, S. E., A. Herren & D. J. Irschick (2004): Sexual dimorphism in head shape and diet in the cottonmouth snake (*Agkistrodon piscivorus*). – Journal of Zoology, **264**: 53-59.

Vitt, L. J. & J. P. Caldwell (2014): Herpetology - An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. – Academic Press, San Diego, 757 pp. Xavier, V. (2002): Variação entre filhotes de representantes do complexo *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). – Phyllomedusa, **1**: 11-30.

3 ESTRATÉGIAS DE ESTOCAGEM DE ESPERMATOZOIDES EM FÊMEAS DA JARARACA DA AMAZÔNIA, *BOTHROPS ATROX*

3.1 INTRODUÇÃO

O sistema reprodutor feminino de serpentes é constituído por dois ovários e dois ovidutos dispostos assimetricamente. O oviduto é dividido em infundíbulo, tuba, istmo, útero e vagina ou bolsa (URIBE et al., 1998; GIRLING, 2002). Contudo, diferentes nomenclaturas têm sido utilizadas por diversos autores, alguns deles dividem o útero e infundíbulo em duas regiões: anterior e posterior (GUILLETTE; FOX; PALMER, 1989; BLACKBURN, 1998; ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; ROJAS, 2009). Atualmente, Siegel et al. (2011) propõem duas novas nomenclaturas: na primeira o útero seria dividido em porção glandular (onde estão presentes as glândulas endometriais) e porção aglandular (região caudal do oviduto, onde não se encontram glândulas). Na segunda nomenclatura proposta, a tuba é caracterizada como infundíbulo. O infundíbulo apresenta uma subdivisão constituída pelo infundíbulo anterior (região pregueada translúcida) e posterior (região pregueada opaca).

A estocagem de espermatozoides no trato reprodutivo feminino é uma estratégia reprodutiva conhecida em vários grupos de vertebrados amniotas (FOX, 1956; BIRKHEAD; MOLLER, 1993; ZUG, 1993; SIEGEL et al., 2011) e em alguns anamniotas (BIRKHEAD; MOLLER, 1993). Em répteis, a estocagem ocorre em alguns lagartos (SAINT-GIRONS, 1962a; FOX, 1963), serpentes (FOX; DESSAUER, 1962; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; SIEGEL; SEVER, 2006), quelônios (HATTAN; GIST, 1975; GIST; CONGDON, 1998) e crocodilianos (GIST et al., 2008).

Em serpentes, essa estratégia reprodutiva é bem conhecida em diversas famílias de regiões tropicais e temperadas (Leptotyphlopidae, Typhlopidae, Viperidae, Colubridae, Natricidae e Dipsadidae) (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; BOOTH; SCHUETT, 2011; SIEGEL et al., 2011; ROJAS, 2013). Dentre essas famílias, são conhecidas duas regiões no oviduto que alojam os espermatozoides: o infundíbulo posterior, que apresenta túbulos de estocagem de espermatozoides especializados e o útero posterior (região aglandular) (FOX, 1956; HOFFMAN; WIMSATT, 1972; HALPERT; GARSTKA; CREWS, 1982; ALDRIDGE, 1992; PERKINS; PALMER, 1996; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; SEVER; RYAN, 1999; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; SIEGEL; SEVER,

2006; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a). Nesta última região a estocagem ocorre em sulcos profundos ou através de uma contração uterina, denominada como uterine muscular twisting (UMT) (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; 2002).

O tempo de estocagem e sobrevivência dos espermatozoides pode variar de acordo com a região onde ela ocorre; o maior tempo de estocagem relatado e confirmado geneticamente teve duração de cinco anos e ocorreu na região infundibular, em *Crotalus adamanteus* (BOOTH; SCHUETT, 2011). Como os espermatozoides são mantidos por longos períodos é ainda desconhecido. Acredita-se que os espermatozoides podem ser mantidos no trato reprodutivo feminino pela secreção do segmento sexual renal encontrado nos machos ou pelas secreções de substâncias ricas em mucopolissacarídeos, lipídeos e proteínas secretadas pelas glândulas do infundíbulo posterior (FOX, 1956; HOFFMAN; WIMSSATT, 1972; PERKINS; PALMER, 1996; ROJAS, 2009).

Independente da região de estocagem, esta estratégia reprodutiva é extremamente importante, pois permitem as fêmeas reproduzirem na ausência de machos, desde que tenham copulado em períodos anteriores (BLACKBURN, 1998). Além disso, é um requisito obrigatório para algumas fêmeas de serpentes com ovulação dissociada do período de cópula. É o caso das espécies *B. insularis*, *B. jararaca* e *B. leucurus* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; KASPEROVICZUS, 2009; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012). Entretanto, apenas em *B. jararaca* foram observados espermatozoides em túbulos de estocagem de espermatozoides na região do infundíbulo posterior e em sulcos no útero posterior (KASPEROVICZUS, 2013). Nas espécies *B. insularis* e *B. leucurus* a estocagem ocorre somente no útero posterior (KASPEROVICZUS, 2009; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012), não tendo sido realizada análise da região do infundíbulo nessas espécies. Assim, mais estudos histológicos das possíveis regiões de armazenamentos de espermatozoides (útero e infundíbulo) são necessários, para o melhor entendimento e caracterização desse fenômeno nas espécies do gênero *Bothrops*. Além disso, a estocagem de espermatozoides em *Bothrops* apresenta diversas vantagens: a gestação ocorre nos períodos mais quentes do ano, propiciando o desenvolvimento embrionário e a diminuição de anormalidades fetais (HUBERT, 1985; HARTMANN; MARQUES; ALMEIDA-SANTOS, 2004; LOURDAIS et al., 2004) e o nascimento dos filhotes ocorre na estação com maior disponibilidade de alimento (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997).

Desta forma, a jararaca da Amazônia é um ótimo modelo para estudar essa estratégia reprodutiva pelos seguintes motivos: (1) na Amazônia a temperatura é uniforme ao longo do ano, propiciando a prenhez (BEEBE, 1946; OLIVERIA, 2003; SILVA; ALMEIDA-

SANTOS, [2015] em fase de elaboração⁴) e nascimentos em vários meses do ano (FITCH, 1970; OLIVERIA, 2003; SILVA; ALMEIDA-SANTOS, [2015] em fase de elaboração⁴); (2) a literatura aponta que o desenvolvimento embrionário pode ter início no mesmo período de cópula (OLIVEIRA, 2003). Além disso, informações de estocagem para serpentes amazônicas são inexistentes.

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar microscopicamente o útero posterior e infundíbulo posterior da jararaca da Amazônia para a identificação de possíveis receptáculos de estocagem. Além disso, a região uterina foi analisada macroscopicamente para a investigação da contorção da musculatura uterina (UMT).

3.2 MATERIAL E MÉTODO

Analizamos 58 amostras de útero posterior e 52 de infundíbulo posterior, de fêmeas adultas da espécie *Bothrops atrox*, preservadas nas seguintes coleções científicas: Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Acre (UFAC); Laboratório de Pesquisas Zoológicas das Faculdades Integradas do Tapajós, Pará (LPZ); Coleção Herpetológica de Anfíbios e Répteis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA); Coleção de Referência da Herpetofauna de Rondônia (CRHRO); Coleção de Répteis do Museu de Zoologia da Unicamp (ZUEC); Coleção de Vertebrados, Mato Grosso (UFMT); Coleção do Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ) e Coleção do Museu de Ciência e Tecnologia da PUC (MCP-PUC/RS) (Apêndice B).

Para verificar as possíveis regiões de armazenamento de espermatozoides na serpente *B. atrox*, foram retiradas pequenas amostras de 1 cm do útero posterior e infundíbulo posterior. O material retirado foi preservado em álcool a 70% e processado em microscopia de luz pelo método de parafina. A espessura dos cortes transversais e longitudinais foi de 5 µm, corados pelo método de coloração básica, hematoxilina-eosina (H/E) (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979). Além disso, macroscopicamente foi observada a contração da musculatura uterina quando presente.

---

⁴ SILVA, K. M. P.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Biologia reprodutiva de machos e fêmeas da jararaca da Amazônia *Bothrops atrox*: uma abordagem macroscópica e microscópica, [2015].

3.3 RESULTADOS

A contração da musculatura uterina (UMT; Figura 13A) foi observada em 13 fêmeas ($n=7$ vitelogênese primária (V1); $n= 3$ vitelogênese secundária (V2); $n= 2$ prenhes; $n= 1$ pós-parto). No entanto, espermatozoides agregados nos sulcos da região uterina foram encontrados somente em duas fêmeas vitelogênicas (V2) (Tabela 2, Figura 13B, C).

Figura 13 – Útero Posterior de *B. atrox*

Fonte: (SILVA, K. M. P., 2014).

Legenda: (A) seta indica a contração da região uterina (UMT). (B) Corte histológico transversal do UMT, 100x. (C) Corte histológico transversal do UMT, 10x. Hematoxilina e eosina; * espermatozoides em sulcos na região uterina.

Além disso, três fêmeas de *B. atrox* em vitelogênese secundária, apresentaram estocagem de espermatozoides na região do infundíbulo posterior (Figura 14A), em glândulas tubulosas simples ramificadas, com presença de algumas células ciliadas. Dentre as fêmeas que continham espermatozoides estocados no infundíbulo, apenas duas apresentaram a contração da musculatura uterina (Tabela 2). Contudo, somente uma fêmea encontrada em março (estação de acasalamento) apresentou espermatozoides em ambas às regiões, no útero posterior - apenas alguns resquícios de espermatozoides e no infundíbulo posterior em receptáculos formados a partir da invaginação do epitélio. Este fato pode indicar que os espermatozoides ascendem do útero logo após a cópula para o lúmen infundibular (Figura 14B), e do lúmen os espermatozoides são invaginados pelo próprio epitélio infundibular (Figura 14C, D), formando as glândulas tubulosas simples ramificadas (Figura 14E, F). Todas as fêmeas com espermatozoides armazenados no útero ou infundíbulo posterior estavam no período de cópula (Tabela 2)

Tabela 2 – Fêmeas que apresentaram estocagem de espermatozoides na região uterina e infundibular. FEC: final da estação chuvosa; * espermatozoides agregados na região do útero posterior; ** espermatozoides presentes nos túbulos de estocagem de espermatozoides no infundíbulo posterior

Espécie	Procedência	Estação	Vitelogênese	Presença de UMT	Útero*	Infundíbulo**
<i>B. atrox</i>	Floresta nacional do Tapajós, Pará.	FEC abril	Secundária	Não	Não	Sim
<i>B. atrox</i>	Santarém, Pará.	FEC abril	Secundária	Sim	Não	Sim
<i>B. atrox</i>	Manaus, Amazonas.	FEC abril	Secundária	Sim	Sim	Não
<i>B. atrox</i>	Alenquer, Pará	FEC março	Secundária	Sim	Sim	Sim

Figura 14 – Infundíbulo Posterior de *B. atrox*

Fonte: (SILVA, K. M. P., 2014).

Legenda: (A) Circulo indica a região coletada do infundíbulo posterior. (B) Corte histológico transversal, * espermatozoides no lúmen infundibular, 40x. (C) Corte histológico transversal, * espermatozoides sendo invaginados pelo próprio epitélio infundibular, com auxílio de células ciliadas (CL), 100x. (D) Corte histológico transversal, * espermatozoides sendo invaginados, 100x. (E) Corte histológico transversal, * espermatozoides na glândula tubulosa simples, 100x. (F) Corte histológico transversal, * espermatozoides na glândula tubulosa simples. Hematoxilina e eosina.

3.4 DISCUSSÃO

A contração da musculatura uterina é comumente observada em fêmeas das espécies do gênero *Bothrops* em vitelogênese secundária e em alguns casos em vitelogênese primária (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; YAMANOUYE et al., 2004; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a). Em *B. atrox* foi observado que o UMT pode ocorrer em diversos estágios reprodutivos (vitelogênese primária e secundária, prenhes e pós-parto). No entanto, observamos espermatozoides nesta região apenas nas fêmeas em vitelogênese secundária.

Siegel e Sever em 2006 questionaram se a região do útero posterior é realmente válida como local de estocagem ou trata-se apenas de um local de agregação de espermatozoides, uma vez que as causas e funções dessas agregações não são muito conhecidas. Sabe-se, no entanto, que a formação do UMT está relacionada com hormônios sexuais, principalmente com o estradiol e com a arginina vasotocina na manutenção e estabilidade da contração (YAMANOUYE et al., 2004). Assim, as variações dos níveis desses hormônios podem determinar a estabilidade do UMT durante do ciclo reprodutivo (YAMANOUYE et al., 2004). Além disso, Marinho et al. (2009) observaram que a fisiologia do fluido seminal modifica-se após entrar no útero posterior, e este também pode secretar um fluido seminal para ajudar a manter a viabilidade dos espermatozoides.

Para Fox (1956), os espermatozoides estocados na região do útero posterior são oriundos de um possível acasalamento recente e em um curto período seriam atraídos para o infundíbulo posterior, onde seriam maiores as chances de fertilização. Pois na maioria das espécies de serpentes os espermatozoides na região uterina não estão associados a estruturas especializadas, são apenas encontrados no lúmen e em sulcos profundos (SEVER; RYAN, 1999). Os túbulos de estocagem de espermatozoides são encontrados apenas no infundíbulo (FOX, 1956; SAINT-GIRONS, 1957, 1962a; ALDRIDGE, 1992; BLACKBURN, 1998; SIEGEL; SEVER, 2006).

Em *Thamnophis sirtalis* um estudo com 44 fêmeas, foi observado que os espermatozoides sobrevivem por um mês após a cópula no útero (RAHN, 1940). Estudos mais recentes apresentaram resultados similares em *Agkistrodon piscivorus* (SIEGEL; SEVER, 2008a), *Vipera aspis* (SAINT-GIRONS, 1957) e *Cerastes cerastes* (SAINT-GIRONS, 1962b), os espermatozoides são agregados na região uterina posterior após o acasalamento e antes da ovulação ascendem para o infundíbulo.

Desta forma, esses trabalhos citados anteriormente e os dados apresentados aqui, corroboram a hipótese de Fox (1956). Todas as fêmeas de *B. atrox* continham espermatozoides no útero posterior e infundíbulo posterior no mesmo período, ou seja, na estação reprodutiva, que ocorre nos meses março a junho (OLIVERIA, 2003; SILVA; ALMEIDA-SANTOS, [2015] em fase de elaboração⁴). Dentre as fêmeas de *B. atrox* que apresentaram estocagem, encontramos um espécime com espermatozoides em ambas as regiões (útero posterior e infundíbulo posterior). Tal fato pode indicar que os espermatozoides após o acasalamento ascendem imediatamente para o infundíbulo.

Todavia, mais estudos são necessários, pois serpentes podem estocar espermatozoides na região infundibular por longos períodos (BOOTH; SCHUETT, 2011). Os espermatozoides encontrados na região uterina e principalmente infundibular nos períodos de acasalamentos, não podem ser indicativos de cópula recente (BOOTH; SCHUETT, 2011; ROJAS, 2013). Além disso, foi observado em *Agkistrodon piscivorus* (SIEGEL; SEVER, 2008a, b) e *Tantilla coronate* (ALDRIDGE, 1992) que os espermatozoides na região infundibular estão presentes nos receptáculos meses após a ovulação.

As glândulas tubulosas são formadas após a cópula por invaginações do próprio epitélio infundibular e são compostas por células ciliadas e células secretoras não ciliadas, sendo conhecida para várias espécies de viperídeos (*Cerastes cerastes*, SAINT-GIRONS, 1962b; *Crotalus viridis*, LUDWIG; RAHN, 1943; *Vipera aspis*, SAINT-GIRONS, 1957; *Bothrops erythromelas*, BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014b e *Bothrops atrox*, este estudo). A função das células ciliadas segundo Fox (1956) seria a de guiar os espermatozoides até os receptáculos (glândulas alveolares ramificadas ou tubulosas simples) por meio de uma corrente contrária no lúmen ovidutal.

Os receptáculos de estocagem podem apresentar diversas morfologias, no caso das serpentes da família Viperidae, *Agkistrodon piscivorus* (SIEGEL; SEVER, 2008a), *Cerastes cerastes* (SAINT-GIRONS, 1962b), *Vipera aspis* (SAINT-GIRONS, 1957) e *B. atrox* (este estudo) os receptáculos são formados por glândulas tubulosas simples ramificadas. Enquanto que os Colubridae, *Diadophis punctatus* (PERKINS; PALMER, 1996), *Thamnophis sirtalis* (FOX, 1956), *Liophis miliaris*, *Oxyrhopus guibei* e *Philodryas patagoniensis* (ROJAS, 2013) os receptáculos são constituídos por glândulas mais especializadas (glândulas alveolares).

Para a jararaca da Amazônia sugerimos que a região do útero posterior, primeiramente seja uma região de curto período de estocagem durante a cópula, onde ocorreria a seleção dos espermatozoides, ou apenas como um plug copulatório para assegurar os espermatozoides na região uterina e logo seriam atraídos para o infundíbulo, onde poderiam permanecer estocados

por meses após a cópula. Diferentemente de outras espécies de *Bothrops*, a estocagem de espermatozoides em *B. atrox* é independente do clima, mas parece estar relacionada com a pluviosidade - a vitelogênese secundária é observada principalmente na estação chuvosa (SILVA; ALMEIDA-SANTOS, [2015] em fase elaboração⁴), e com a condição corporal das fêmeas.

A condição corporal das fêmeas também é extremamente importante para dar início o processo da vitelogênese secundária. Algumas serpentes, bem como outros animais ectotérmicos, não se reproduzem até acumularem energia suficiente para custear a reprodução, pois a gordura abdominal é transformada em vitelo (AUBRET et al., 2002; BONNET, 2011). Para um indivíduo obter sucesso reprodutivo, as condições fisiológicas, internas (hormônios) e externas (temperatura, precipitação e disponibilidade energética) precisam estar adequadas (DENARDO; TAYLOR, 2011). As mudanças climáticas, interações sociais, alimentação e saúde, podem influenciar na capacidade reprodutiva do indivíduo, como o investimento e comportamento reprodutivo (WINGFIELD; KITAYSKY, 2002). Portanto as fêmeas de *B. atrox* poderiam aguardar a melhor época para se reproduzirem caso as condições fisiológicas não estejam favoráveis.

Sendo assim, a estocagem de espermatozoides e a contração da musculatura uterina entre as espécies do gênero *Bothrops* pode apresentar características conservadas, provavelmente influenciadas pela inércia filogenética (BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a, b), entretanto, mais estudos são necessários para avaliar essa influência. A estocagem na região uterina pode ser uma condição ancestral em répteis e as estruturas mais especializadas de armazenamento de gametas masculinos (infundíbulo) provavelmente evoluiu secundariamente e de forma independente nas linhagens principais de Squamata (SAINT-GIRONS, 1975; SIEGEL et al., 2011).

3.5 CONCLUSÕES

Assim, descrevemos pela primeira vez a estocagem de espermatozoides para a jararaca da Amazônia. A estocagem em *B. atrox* primeiramente pode ocorrer no útero pela contração da musculatura uterina. E logo após a cópula, ou antes, da ovulação os espermatozoides ascenderiam para o infundíbulo posterior, onde permaneceriam em receptáculos de esperma.

Entretanto, o tempo exato da permanência ou sobrevivência dos espermatozoides na região uterina ou infundibular não são claros. Assim, mais informações são necessárias para esclarecer o papel da estocagem de esperma de curta ou longa duração dentro das estratégias reprodutivas empregadas por *B. atrox*.

REFERÊNCIAS

- AUBRET, F.; BONNET, X.; SHINE, R.; LOURDAIS, O. Fat is sexy for females but not males: the influence of body reserves on reproduction in snakes (*Vipera aspis*). **Hormones and Behavior**, v. 42, p.135-47, 2002.
- ALDRIDGE, R. D. Oviductal anatomy and seasonal sperm storage in the southeastern crowned snake (*Tantilla coronata*). **Copeia**, v. 4, p. 1103-1106, 1992.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Long-term sperm storage in the Neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalidae). **Japanese Journal of Herpetology**, v. 17, n. 2, p. 46-52, 1997.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ORSI, A. M. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morfologia e função do oviduto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 2, p. 109-112, 2002.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. **Biology of the vipers**. Carmel: Eagle Mountain, 2002. p. 445-462.
- BARROS, V. A.; SUEIRO, L. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of phylogenetic conservatism of reproductive patterns. **Herpetological Journal**, v. 22, p. 97-104, 2012.
- BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Is rainfall seasonality important for reproductive strategies in viviparous Neotropical pit vipers? A case study with *Bothrops leucurus* from the Brazilian Atlantic Forest. **Herpetological Journal**, v. 24, p. 69-77, 2014a.
- BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. **Advances in Zoology**, v. 2014, p. 01-11, 2014b.
- BEEBE, W. Field notes on the snakes of Kartabo, British Guiana and Caripito, Venezuela. **Zoologica**, v. 31, p. 11-52, 1946.
- BIRKHEAD, T. R.; MOLLER, A. P. Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 50, p. 295-311, 1993.
- BLACKBURN, D. G. Structure, function, and evolution of the Oviducts of Squamate Reptiles, with special reference to viviparity and placentation. **Journal of Experimental Zoology**, v. 282, p. 560-617, 1998.
- BONNET, X. In the evolution of semelparity. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Enfield, New Hampshire: Science Publishers, 2011. p. 645-74.

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

DENARDO, D. F.; TAYLOR, E. Hormones and reproduction in free-ranging snakes. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Enfield: CRC Press, 2011. p. 347-409.

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

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

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

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

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

GIST, D. H.; CONGDON, J. D. Sperm storage as a reproductive tactic in turtles. **Journal of Experimental Zoology**, v. 282, p. 526-534, 1998.

GIST, D. H.; BAGWILL, A.; LANCE, V.; SEVER, M. D.; ELSEY, R. M. Sperm storage in the oviduct of the american Alligator. **Journal of Experimental Zoology**, v. 309, p. 581-87, 2008.

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

HALPERT, A. P.; GARSTKA, W. R.; CREWS, D. Sperm transport and storage and its relation to the annual sexual cycle of the female red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*. **Journal of Morphology**, v. 174, p. 149-59, 1982.

HARTMANN, M. T.; MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of the southern Brazilian pitviper *Bothrops neuwiedi pubescens* (Serpentes, Viperidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 25, p. 77-85, 2004.

HATTAN, L. R.; GIST, D. H. Seminal receptacles in the eastern box turtle, *Terrapene carolina*. **Copeia**, n. 3, p. 505-510, 1975.

HOFFMAN, L. H.; WIMSATT, W. A. Histochemical and electron microscopic observations on the sperm receptacles in the garter snake oviduct. **American Journal of Anatomy**, v. 134, p. 71-96, 1972.

HUBERT, J. Embryology of the squamata. In: GANS, C.; BILLET, F. **Biology of the reptilia**. New York: Wiley and Sons, v.15, p.1-55, 1985.

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

KASPEROVICZUS, K. N. **Biologia reprodutiva da jararaca Ilhoa, *Bothrops insularis*, (Serpentes: Viperidae) da Ilha da Queimada Grande, São Paulo**. 2009. 126 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

KASPEROVICZUS, K. N. **Evolução das estratégias reprodutivas de *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. 2013. 135 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

LOURDAIS O.; SHINE R.; BONNET X.; GUILLON M.; NAULLEAU G. Climate affects embryonic development in a viviparous snake, *Vipera aspis*. **Oikos**, v. 104, p. 551-60, 2004.

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

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

OLIVEIRA, M. E. **História natural de jararacas brasileiras do grupo *Bothrops atrox* (serpentes: Viperidae)**. 2003. 131 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade do Estado de São Paulo. Rio Claro, 2003.

PERKINS, M. J.; PALMER, B. D. Histology and functional morphology of the oviduct of an oviparous snake, *Diadophis punctatus*. **Journal of Morphology**, v. 227, p. 67–79, 1996.

RAHN, H. Sperm viability in the uterus of the garter snake, *Thamnophis*. **Copeia**, n. 2, p. 107-115, 1940.

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

ROJAS, C. A. **Padrões de estocagem de esperma e variação cíclicas ovidutais em serpentes *Xenodontinae***. 2013. 174 p. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

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

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

SAINT-GIRONS, H. Le cycle reproducteur de la vipère à cornes, *Cerastes cerastes* (L.), dans la nature et en captivité. **Bulletin de la Société Zoologique de France** v. 87, p. 41-51, 1962b.

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

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

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

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

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

SIEGEL, D. S.; MIRALLES, A.; CHABARRIA, R. E.; ALDRIDGE, R. D. Female reproductive anatomy: cloaca, oviduct, and sperm storage. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Enfield: CRC Press, 2011. p. 347-409.

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

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

WINGFIELD, J. C.; KITAYSKY, A. S. Endocrine responses to unpredictable environmental events: Stress or anti-stress hormones? **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 600–609, 2002.

ZUG, J. R. **Herpetology, an introductory biology of amphibians and reptiles**. San Diego: Academic Press, 1993.

APÊNDICE

APÊNDICE B – Identificação das fêmeas de *B. atrox* analisadas

INPA – Coleção Herpetológica de Anfíbios e Répteis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - 31484, 11906.

LPZ – Laboratório de Pesquisas Zoológicas das Faculdades Integradas do Tapajós - 1530, 1729, 2585, 5556, 1283, 5554, 1728, 1674, 1920, 5557, 4898, 3319, 3170, 1117, 2680, 1084, 1251, 3597, 5503, 2808, 2236, 2224, 3796, 1112, 2684, 2760, 3679, 5627, 5628, 5142, 5600, 5636, 5635, 5787, 5783, 2655, HMC 263, 4298, HMC 27, HMC 78.

MNRJ – Coleção do Museu Nacional do Rio de Janeiro - 16822, 15008, 958, 3003, 967, 3411, 16824, 17965, 17966, 14244.

UFAC – Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Acre - 16, 255.

PUC/RS – Coleção do Museu de Ciências e Tecnologia - 8896, 7922.

UFMT – Coleção de Vertebrados do Mato Grosso - 7223, 7228, 6220, 7778, 8232, 8907, 8215, 8581, 7704.

CRHRO – Coleção de Referência da Herpetofauna de Rondônia - 165.

4 CONCLUSÕES GERAIS

O ciclo reprodutivo dos machos e fêmeas de *B. atrox* diferiu das demais espécies do gênero *Bothrops*, tal fato foi observado pelas diferenças de habitat. Na Amazônia a temperatura é constante, apenas apresenta duas estações definidas, a chuvosa e a seca. Assim, para os machos foi observada atividade testicular em todos os períodos do ano, entretanto, a espermiogênese foi sazonal. Para as fêmeas a prenhez e a parturição ocorre em vários meses do ano independente do clima. A plasticidade encontrada no ciclo reprodutivo das fêmeas foi determinada pela estocagem de espermatozoides, presente no útero posterior e infundíbulo posterior, encontrada pela primeira vez na jararaca da Amazônia. Para os filhotes encontramos diferenças na coloração da região gular e ponta da cauda entre machos e fêmeas. Indicamos o dicromatismo sexual entre filhotes como uma forma fácil de distinguir o sexo, já que estes não apresentam dimorfismo sexual evidente nos caracteres morfológicos.

REFERÊNCIAS

- BEEBE, W. Field notes on the snakes of Kartabo, British Guiana and Caripito, Venezuela. **Zoologica**, v. 31, p. 11-52, 1946.
- BERNARDE, P. S.; ABE, A. S. Hábitos alimentares de serpents em Espigão do Oeste, Rondônia, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, n.1, p. 167-173, 2010.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. Ithaca: Cornell University Press, 2004. p. 870.
- CUNHA, O. R.; NASCIMENTO, F. P. Ofídios da Amazônia VII—as serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops* (jararacas) e *Lachesis* (surucucu) da região leste do Pará (Ophidia, Viperidae). **Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 83, p. 1-42, 1975.
- CUNHA, O. R.; NASCIMENTO, F. P. Ofídios da Amazônia X—as cobras da região leste do Pará. Publ. **Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 83, p. 218, 1978.
- CUNHA, O. R.; NASCIMENTO, F. P. Ofídios da Amazônia XIV—as espécies de *Micrurus*, *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus* do sul do Pará e oeste do Maranhão, incluindo áreas de cerrado deste estado. (Ophidia: Elapidae e Viperidae). **Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 112, p.1-58, 1982.
- DIXON, J. R.; SOINI, P. The Reptiles of the Upper Amazon Basin, Iquitos Region, Peru. Wisconsin : **Milwaukee Public Museum**, 1986.
- FERNANDES, W.; CARDOSO, S. R. T.; CHAVES, M. M. G.; MIYAJI, C. K.; SANT'ANNA, S. S.; LULA, L. A. B. M. Aspectos reprodutivos de *Bothrops atrox*: Período de cópula e dados sobre a ninhada. In: III **Congresso latino Americano de Herpetologia**, 3., 1993, Campinas.
- FITCH, H. S. Reproductive cycles of lizards and snakes. University of Kansas Museum of Natural History. **Miscellaneous Publications**, v. 52, p. 1-247, 1970.
- MARTINS, M.; GORDO, M. *Bothrops atrox* (Common Lancehead). Diet. **Herpetologica Review**, v. 24, n. 4, p. 151-152, 1993.
- MARTINS, M.; OLIVEIRA, M. E. Natural history of snakes in forests of the Manaus region, Central Amazonia, Brazil. Herpetol. **Natural History**, v. 6, n. 2, p. 78-150, 1998.
- MARTINS, M.; ARAUJO, M. S.; SAWAYA, R. J.; NUNES, R. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of Neotropical pitvipers (*Bothrops*). **Journal of Zoology**, v. 254, n. 4, p. 529-538, 2001.
- OLIVEIRA, M. E.; MARTINS, M. When and where to find a pitviper: activity patterns and habitat use of the lancehead, *Bothrops atrox*, in central Amazonia, Brazil. **Herpetological Natural History**, v. 8, n. 2, p. 101-110, 2001.

OLIVEIRA, M. E. **História natural de jararacas brasileiras do grupo *Bothrops atrox* (serpentes: Viperidae)**. 2003. 131 p. Tese (Dourado) – Instituto de Biociências da Universidade do Estado de São Paulo. Rio Claro, 2003.

OLIVEIRA, M. E.; MARTINS, M. *Bothrops atrox* (Common Lancehead). Prey. **Herpetological Review**, v. 34, n. 1, p. 61-62, 2003.

PARDAL, P. P. O.; MONTEIRO, M. R. C. C.; ARNAUND, R. N.; LOPES, F. O. B.; ASANO, M. E. Aspectos epidemiológicos de 465 acidentes ofídicos atendidos no HUIBB - Belém - Pará, no período de 1993–1994. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, p. 172, 1995.

SÁ NETO, R. P.; SANTOS, M. C. Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos atendidos no Instituto de Medicina Tropical de Manaus (IMTM), 1986–92: estudo retrospectivo. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 28, p. 171, 1995.

TURCI, L. C. B.; ALBUQUERQUE, S.; BERNARDE, P. S.; MIRANDA, D. B. Uso do habitat, atividade e comportamento de *Bothriopsis bilineatus* e de *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae) na floresta do Rio Moa, Acre – Brasil. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 3, p. 198-206, 2009.

WÜSTER, W.; THORPE, R. S.; PUORTO, G.; BBBSP. Systematics of the *Bothrops atrox* complex (Reptilia: Serpentes: Viperidae) in Brazil: a multivariate analysis. **Herpetologica**, v. 52, p. 263–271, 1996.

WUSTER, W.; SALOMÃO, M. G.; THORPE, R. S.; PUORTO, G.; FURTADO, M. F. D.; HOGE, S. A.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Systematics of the *Bothrops atrox* complex: new insights from multivariate analysis and mitochondrial DNA sequence information. In: THORPE, R. S.; WUSTER, W.; MALHOTRA, A. **Venomous snakes: ecology, evolution and snakebite**. New York: Oxford University Press, 1997. p. 99-113.

WUSTER, W.; SALOMÃO, M. G.; DUCKETT, G. J.; THORPE, R. S.; BBBSP. Mitochondrial DNA phylogeny of the *Bothrops atrox* species complex (Squamata: Serpentes: Viperidae). **Kaupia**, v. 8, p. 135-144, 1999.

WÜSTER, W.; SALOMÃO, M. D. G.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A.; THORPE, R. S. Origins and evolution of the South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. **Biology of the vipers**. Eagle Mountain, UT: Eagle Mountain Publishing, 2002. p. 111–128.