SELMA MARIA ALMEIDA-SANTOS

Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e
placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca*
(Serpentes: Viperidae)

São Paulo
2005

SELMA MARIA ALMEIDA-SANTOS

Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação
em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Marcos Orsi

São Paulo
2005

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1532 FMVZ	<p>Almeida-Santos, Selma Maria</p> <p>Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em <i>Crotalus durissus</i> e <i>Bothrops jararaca</i> (Serpentes: Viperidae) / Selma Maria Almeida-Santos. – São Paulo : S. M. Almeida-Santos, 2005.</p> <p>204 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2005.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.</p> <p>Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcos Orsi.</p> <p>1. Placenta. 2. Serpentes. 3. Reprodução animal. 4. Estocagem de esperma. 5. Sazonal I. Título.</p>
----------------	---

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de espermatozoides e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes - Viperidae)", protocolo nº517/2004, utilizando 30 cadáveres de cascavéis, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio Marcos Orsi, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Reproductive pattern in snakes: Storage of sperm and placentation in *Crotalus durissus* and *Bothrops jararaca* (Serpentes - Viperidae)", protocol number 517/2004, utilizing 30 corpses of snakes, under the responsibility of Prof. Dr. Antonio Marcos Orsi, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 15 de fevereiro de 2005

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO
INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB)
Av. Vital Brasil, 1500 CEP 05503-900 Tel. 011-37267222 r.2239 Fax 011-37261505

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 076/2002, referente ao projeto “Anatomia e biologia reprodutiva comparada em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca*”, de responsabilidade da pesquisadora Selma Maria de Almeida Santos está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB).

São Paulo, 12 de agosto de 2002.

Wilson Fernandes
Presidente da CEUAIB

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: ALMEIDA-SANTOS, Selma Maria

Título: Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Aos meus irmãos que incondicionalmente sempre me apoiaram;

A minha mãe pelo exemplo de vida, perseverança e alegria;

Ao meu querido, amado e saudoso pai (em memória).

Ao meu amado esposo, Silvio, meu companheiro e amigo.

*Obrigada pela paciência, apoio e por me fazer acreditar
na realização dos meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor, Dr. Antonio Marcos Orsi pela confiança, orientação no trabalho, preocupação e carinho.

A Professora Dr. Maria Angélica Miglino, pelo apoio a esse trabalho e pelo exemplo de luta, coragem e principalmente por me apresentar ao Prof. Orsi.

Ao amigo Otavio pelo carinho e grande incentivo profissional.

A amiga Iara Lúcia, obrigada por acreditar em mim.

A amiga Graça por todos esses anos de trabalhos, lutas, convívio e amizade!

A todos os meus colegas do Butantan, obrigado pelo carinho e ajuda!

Em especial a Darina, D. Maria, Myriam, Rodrigo, Ricardo, Herbert, Lígia, Leonardo, Karina, Mary, Einat, Aracy, Cláudio, Joãozinho, Murilo, Fátima, Fausto, Marisa, Kiko, Cristina, Fernanda, Marcelo, Antonio Carlos, D. Vera, Zé Pedro, Eladio, Amauri, Marlene, Carlinhos, Wilson, Sávio, Silvia, Mariza, Radenka, Marcelo S. Ida Norma.

A Maria de Fátima Furtado sou grata pelo incentivo, ao longo desses anos!

Ao Donizete Pereira, Antonio Ribeiro da Costa e Antonio Bordignon pelos desenhos e fotografias desta tese!

A Amélio S. Parpinelli, pelas sugestões cartográficas

Ao Ricardo e Rodrigo por me ajudarem com as estatísticas complicadas...

Ao Valdir, obrigado pela amizade, ajuda e compreensão!

A Alessandra, minha amiga corajosa obrigada pelo apoio e paciência.

A Martinha e ao Jared, pelo convívio, lições de vida e pelo companheirismo desses anos.

E a todos que, de algum modo, tornaram possível a realização deste trabalho.

A todos os meus colegas da anatomia, Moacir, Marina, Marcelo, Assis, Piolha, Tatiana, Flavinha, Caju, Ana, Hildebrando, Fernanda, Paulinho... a convivência com vocês foi maravilhosa!

Em especial, minha amiga Luca, pela compreensão e carinho imensuráveis.

Aos funcionários “Indio”, Jaqueline, Kazue, Ronaldo e Maicon e principalmente ao Wanderley, que me auxiliou em todo esse período, muito obrigado!

Aos Professores Pedro, Guto, Nanci, Paula, Zé Roberto, Francisco e Irvênia pelo convívio durante o curso e pelos ensinamentos.

A Biblioteca pelo apoio a esse trabalho.

A CAPES, o auxílio do desenvolvimento desse trabalho.

As amigas eternas e queridas Ana Lúcia e Maria Inês...

À minha família, em especial a minha mãe, que sempre me ajudou e ao meu pai e meu irmão Celso (em memória).

Aos meus irmãos, Adelino e Silmara, por toda ajuda e paciência em todos esses anos. Por me abrirem caminho para a realização dos meus sonhos.

Ao meu esposo, Silvio, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos!

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese e que por esquecimento não foram mencionados.

Obrigada a todos!

"Se queres ser universal, canta a
tua aldeia."

Leon Tolstoi

RESUMO

ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae):** [Reproductive patterns: sperm storage and placentation in *Crotalus durissus* and *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)]. 2005. 204 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

As serpentes “pitvipers” *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* apresentam um ciclo reprodutivo sazonal com um estágio de desenvolvimento folicular ativo (vitelogênese Tipo II) no final do verão e início de outono. A cópula ocorre no outono (março até maio) e a gestação na primavera até o início do verão quando os nascimentos acontecem (Dezembro até Março). Depois do parto as serpentes permanecem em estado de quiescência folicular, o que as impede de reproduzir na próxima estação do mesmo ano. Assim, cada fêmea madura da população reproduz-se a cada dois anos caracterizando um ciclo reprodutivo bienal. A morfologia do trato reprodutivo em ambas as espécies mostra ovários e ovidutos assimétricos. Cada oviduto é dividido em três regiões distintas, a saber o infundíbulo, o útero (posterior e anterior) e a vagina. A assincronia entre a vitelogênese e a fertilização promove uma estocagem de esperma obrigatória. Esse processo ocorre na porção posterior do útero, por meio de uma contração muscular. Estudos morfofisiológicos do oviduto da jararaca e da cascavel combinados, com o uso de microscopias de luz, transmissão e varredura nunca foram conduzidos antes. A anatomia macroscópica do útero depois da cópula é caracterizada por uma torção e uma contração da musculatura uterina lisa longitudinal, a qual forma uma espiral. O útero permanece visivelmente contraído até a ovulação em setembro (início de primavera). O desenvolvimento embrionário ocorre no útero. Cada ovo ou embrião é isolado por uma constrição que funciona como uma implantação. A íntima aposição epitélio corioalantóico com o epitélio uterino indica que a placenta é do tipo epiteliocorial. As especializações da alantoplacenta em ambas as espécies caracteriza a placenta como (Tipo II).

Em ambas as serpentes o oviduto parece ser um órgão capaz de exercer funções diferentes como a retenção e estocagem de esperma, manutenção e transporte dos ovos, fertilização e manutenção do embrião (gestação e placentação uterina). Machos de *Bothrops* e *Crotalus* mostram dois testículos alongados que se comunicam bilateralmente na cloaca por meio dos ductos deferentes convolutos. O diâmetro mais largo do ducto deferente, na porção distal foi observado no verão e outono, devido a espermiogênese, que ocorre um pouco antes da cópula. Em ambas as espécies observam-se um aumento dos testículos na primavera e verão provavelmente relacionada a espermatogênese, a qual também não é sincronizada com a cópula (outono) e a fertilização (setembro/outubro). Todas estas estratégias fisiológicas e morfológicas, tanto em machos quanto em fêmeas das duas espécies de serpentes promovem a liberação simultânea dos gametas no início da primavera (setembro), de modo a tornar harmônico o ciclo reprodutivo dos machos e das fêmeas.

Palavras-chave: Placenta. Serpentes. Reprodução animal. Estocagem de esperma. Sazonal.

ABSTRACT

ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Reproductive patterns: sperm storage and placentation in *Crotalus durissus* and *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae).** [Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)]. 2005. 204 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The neotropical pitvipers *Crotalus durissus* and *Bothrops jararaca* show a sazonal reproductive cycle with an active stage of follicular development (vitellogenesis Type II) in late austral autumn and winter. Mating occurs in early to middle autumn (March to May) and gestation occurs in spring up to early summer when birth takes place (December up to March). After parturition snakes show a follicular quiescence which prevents them to reproduce in the following season of the same year. Therefore they skip one reproductive season characterizing a biennial reproductive cycle. Morphology of the reproductive tracts in both species showed the presence of unpaired ovaries and oviducts. Each oviduct is divided in four distinct regions, namely infundibulum, posterior and anterior uterus, and vagina. The lack of synchrony between vitellogenesis and fertilization, makes female store sperm obligatory. Sperm storage in both snakes occurs in the posterior portion of the uterus by means of a uterine muscle contraction and convolution. Morphological studies of the oviduct of jararaca and rattlesnakes combining the use of LM, TEM and SEM has never been carried out before. Macroscopical anatomy of the uterus after mating is characterized by convolution and contraction of the longitudinal smooth musculature which formed a spiral. The uterus remains visibly convoluted until ovulation occurs in September (early spring). Embryo development occurs in the uterus; each egg or embryo is isolated by a uterine short constricted segment that probably works as an implantation chamber like a placenta. The intimate

apposition of the uterine lining with the chorioallantois indicates that the placenta is epitheliochorial type. The allantoaplacenta, in both species develop folds in uterine and embryonic epithelia characterizing the second category of placenta (Type II). In both the species the oviduct has demonstrated to be an organ capable of some different functions such as sperm retaining and storage, egg uptake and transport, fertilization, maintenance of the embryo (uterine gestation and placentation) and parturition. Males of *Bothrops* and *Crotalus* show two elongated testes which communicate bilaterally with the cloaca through the coiled deferent ducts. The largest diameter of deferent ducto, was observed in summer and autumn, due to intense spermiogenesis, just before the mating season. In both species an increase in size of the testes was observed in spring and summer probably related with seasonal spermatogenesis, which is asynchronous in relation to mating (autumn). All these physiological and morphological strategies both in male and female *B. jararaca* and *C. durissus* promote simultaneous liberation of gamets in early spring (september), in such a way to make reproductive cycle harmonic in these crotaline pitvipers.

Key Words: Placenta. Snakes. Animal reproduction. Storage sperm. Seasonal.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	ORIGENS E EVOLUÇÃO DE RÉPTEIS	19
1.2	ASPECTOS TAXONÔMICOS DAS SERPENTES.....	21
1.3	HISTÓRIA NATURAL DE <i>CROTALUS DURISSUS</i> E <i>BOTHROPS</i> <i>JARARACA</i>	24
1.4	OBJETIVOS	31
1.4.1	Objetivo geral	31
1.4.2	Objetivos específicos	31
2	REVISÃO DE LITERATURA	34
2.1	DIVERSIDADE ESTRUTURAL DO OVIDUTO REPTILIANO	34
2.2	SURGIMENTO DO OVO AMNIÓTICO.....	35
2.3	EVOLUÇÃO DA VIVIPARIDADE	36
2.4	ESTRUTURA DA PLACENTA	41
2.5	DIVERSIDADE ESTRUTURAL DA PLACENTA	42
2.6	ESTOCAGEM DE ESPERMA	45
2.7	APARELHO REPRODUTOR FEMININO DE SERPENTES.....	47
2.8	APARELHO REPRODUTOR MASCULINO DE SERPENTES.....	50
3	MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1	ANIMAIS	53
3.2	OBTENÇÃO DE BLOCOS PARA MICROSCOPIA	55
3.2.1	Processamento em paraplast ou parafina	56
3.2.2	Processamento em historresina	57
3.2.3	Processamento para microscopia eletrônica de transmissão	57

3.2.4	Processamento para microscopia eletrônica de varredura	57
3.3	COLETA DE SANGUE	58
3.4	DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIO SEXUAL	58
4	RESULTADOS	60
4.1	ANATOMIA DO APARELHO REPRODUTOR DAS FÊMEAS	60
4.1.1	Histofisiologia dos ovários	60
4.1.1.1	Microscopia de luz.....	64
4.1.2	Histofisiologia dos ovidutos	66
4.1.2.1	Microscopia de luz.....	68
4.1.2.2	Microscopia eletrônica de varredura	68
4.1.2.3	Microscopia eletrônica de transmissão	72
4.1.3	Histofisiologia das vaginas	78
4.1.3.1	Microscopia de luz.....	78
4.1.3.2	Microscopia eletrônica de varredura	78
4.1.4	Histofisiologia da placenta	86
4.1.4.1	Microscopia de luz.....	90
4.1.4.2	Microscopia eletrônica de varredura	92
4.1.5	EMBRIÕES	97
4.1.5.1	Saco vitelínico	97
4.1.5.2	Cordão umbilical	104
4.1.5.3	Influências hormonais	104
4.1.5.4	Táticas reprodutivas	109
4.2	ANATOMIA DO APARELHO REPRODUTOR DOS MACHOS.....	118
4.2.1	Histofisiologia dos testículos	120
4.2.1.1	Microscopia de luz.....	120

4.2.1.2	Microscopia eletrônica de varredura	122
4.2.2	Histofisiologia das vias espermáticas	122
4.2.2.1	Microscopia de luz.....	122
4.2.2.2	Microscopia eletrônica de varredura	131
4.2.3	Ciclos testiculares	131
4.2.4	Variações nos diâmetros dos ductos deferentes	134
4.4	DIMORFISMO SEXUAL EM <i>C. DURISSUS</i> E <i>B. JARARACA</i>	139
4.5	DISTRIBUIÇÃO DOS ESPÉCIMES DE JARARACAS E CASCAVÉIS NO ESTADO DE SÃO PAULO	142
4.5.1	Dados epidemiológicos	142
4.5.2	Atividade anual em jararacas e cascavéis	146
4.7	MODELOS REPRODUTIVOS	148
5	DISCUSSÃO	155
5.1	CICLOS OVARIANOS	156
5.2	ESTOCAGEM DE ESPERMA EM FÊMEAS	162
5.3	FERTILIZAÇÃO	165
5.4	PLACENTAÇÃO	167
5.5	NASCIMENTO DOS FILHOTES	172
5.6	TÁTICAS REPRODUTIVAS	172
5.7	CICLOS REPRODUTIVOS MASCULINOS	175
5.8	ESTOCAGEM DE ESPERMA EM MACHOS	177
5.9	MODELOS REPRODUTIVOS	179
6	CONCLUSÕES	182
6.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS	184
	REFERÊNCIAS	186

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Nos parágrafos que se seguem, procurou-se caracterizar de forma sucinta as origens e a evolução dos répteis e a situação taxonômica atual das principais famílias de serpentes, bem como as descrições específicas sobre os gêneros estudados neste trabalho.

1.1 ORIGENS E EVOLUÇÃO DOS RÉPTEIS

Os répteis evoluíram a partir dos anfíbios labirintodontes aproximadamente 60 milhões de anos depois que os primeiros anfíbios surgiram. Desde o Permiano e ao longo do Cretáceo foram os répteis os vertebrados mais abundantes. Foram ainda os primeiros vertebrados que apresentaram requisitos para a vida plenamente terrestre, incluindo o aparecimento do ovo terrestre e as membranas embrionárias e um tegumento resistente à dessecação. Durante a “era dos répteis”, os diferentes gêneros variavam de exemplares pequenos a gigantescos, de herbívoros a carnívoros, de vagarosos a velozes (HILDEBRAND, 1995).

A linhagem dos répteis surgiu, a partir de um amniota ancestral. Uma divergência no ancestral dos répteis originou os grupos Testudines (Chelonia) e Sauria. Os quelônios são exemplificados pelos jabutis, tartarugas e cágados, viventes até os nossos dias. O grupo dos Sauria, por sua vez, deu origem ao ancestral dos Archosauria (crocodilos, aves e dinossauros) e ao ancestral dos Lepidosauria. Deste modo, notamos que os crocodilianos são mais aparentados aos dinossauros e às aves do que aos demais répteis (POUGH, et al., 1998). As duas linhagens de Lepidosauria existentes hoje são representadas pelo Tuatara (*Sphenodon*) da Nova Zelândia e pelos Squamatas (GAUTHIER, et al., 1988; POUGH, et al., 1998).

Squamata formam o maior grupo de Reptilia (exceto Aves), contendo mais de 4.000 espécies de lagartos e 2.700 espécies de serpentes (POUGH et al., 2003).

Os Squamata apresentam hemipênis, ou seja, um par de órgãos copuladores que ficam invertidos, internamente à cauda, quando em repouso. Tal característica é própria e exclusiva deste grupo (GAUTHIER, et al., 1988; RIEPPEL, 1988).

No final do período Permiano (Era Paleozóica) ou início do Triássico (Era Mesozóica), há aproximadamente 230 milhões de anos, provavelmente, surgiram os ancestrais dos Squamata (CARROL, 1977). Durante o Mesozóico as principais linhagens de lagartos e serpentes se diversificaram (CARROL, 1977). A primeira divergência na linhagem dos Squamatas, separou o ancestral de Iguania (Iguanas e Camaleões) do ancestral dos Scleroglossa (demais lagartos, anfisbenídeos e serpentes) (ESTES, et al., 1988). Os lagartos, serpentes e anfisbenídeos caçam utilizando, principalmente, sinais químicos GREENE, 1997 ou seja, transportando partículas odoríferas captadas pela língua bífida para o órgão vomeronasal e capturam seus alimentos com as mandíbulas (POUGH, et al., 1998).

O fóssil mais antigo de serpente, é uma espécie da família Laparentophidae, no final do Cretáceo datando de 130 milhões de anos atrás (RAGE, 1987). Contudo, não há um consenso de como era a serpente ancestral. Isto se deve em parte, por não haver muitos registros fósseis de ofídios em bom estado e por não existir ainda uma hipótese robusta sobre a origem das serpentes e dos grupos mais aparentados (RIEPEL; ZAHER 2000). Há várias hipóteses que sugerem o provável habitat ocupado pela serpente ancestral. Atualmente há duas conjecturas conflitantes. Lee e Caldwell (1998) defendem que as serpentes surgiram a partir de ancestrais mosasaurídeos, isto é de lagartos varanídeos extintos, portanto deveriam ser aquáticas e ocupariam o ambiente marinho. Porém, a hipótese mais aceita é que as serpentes ancestrais eram criptozóicas, caçavam animais que viviam escondidos em tocas e galerias do solo ou folhas, idéias estas defendidas atualmente por Zaher (1998).

Provavelmente possuíam o corpo extremamente alongado, membros e olhos reduzidos, e caçavam usando principalmente quimiossensores (GREENE, 1997). Esta forma animal alongada e com membros reduzidos seria adequada para explorar ambientes subterrâneos. Esse ambiente de pouca luz, seria responsável pela redução dos olhos (BELLAIRS; UNDERWOOD, 1951). Posteriormente, quando as serpentes retornaram à vida na superfície terrestre, o olho evoluiu novamente, porém, sendo ainda diferente da estrutura ocular original dos demais escamados (BELLAIRS; UNDERWOOD, 1951).

As serpentes apresentam como características, para diagnóstico, o corpo extremamente alongado, sem apêndices locomotores e cintura escapular completamente ausente; perda de sínfise mandibular; fechamento lateral da parede da caixa craniana e perda de pálpebras móveis. A perda da sínfise mandibular permite às serpentes abrirem muito a boca e engolirem presas muito grandes. As serpentes são vertebrados, tetrápodos e amniotas. Alguns lagartos e as serpentes não apresentam membros locomotores, mas descendem de animais tetrápodos, portanto são potencialmente considerados como tetrápodos (POUGH, et al., 2003).

1.2 ASPECTOS TAXONÔMICOS DAS SERPENTES

Atualmente são reconhecidas cerca de 18 famílias, mas ainda existem muitas controvérsias sobre sua classificação (LEE; SCANLON, 2002). A maioria das formas atuais pertence à superfamília Colubroidea, que compreendem as famílias de serpentes mais diversificadas: Atractaspididae, Elapidae, Colubridae e Viperidae, tendo as três últimas famílias representantes no Brasil. A família Viperidae, com cerca de 250 espécies distribuídas pelo mundo, são caracterizadas por apresentar aparelho inoculador do tipo solenóglifo, sendo facilmente identificadas pela cabeça triangular, recoberta de pequenas escamas de aspecto

similar ao do corpo (GREENE, 1997; MELGAREJO, 2003). A família Viperidae, tradicionalmente, são atribuídas quatro subfamílias com representantes viventes atualmente: Viperinae, Causinae, Azemiopinae e Crotalinae (GREENE, 1997). A subfamília Crotalinae, pode ser caracterizada pela presença da fosseta loreal localizada bilateralmente entre o olho e a narina. No Brasil, ocorrem 5 gêneros totalizando 30 espécies. Dentre elas estão os gêneros *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Crotalus* e *Lachesis*. O Brasil contém a grande maioria das espécies remanescentes no gênero *Bothrops*, mas apenas duas espécies de *Bothriopsis* e duas de *Bothrocophias*. O “status” de gênero *Bothriopsis* tem sido questionado por alguns autores, sugerindo ser sinônimo de *Bothrops* (SALOMÃO et al., 1997). Por outro lado é considerado válido por Campbell; Lamar (2004) .

O gênero *Bothrops* possui algumas das espécies mais importantes do ponto de vista epidemiológico, já que produzem cerca de 90% dos 20.000 acidentes ofídicos anuais registrados no Brasil. *Bothrops jararaca* é uma espécie de colorido muito variado, apresentando desde tons esverdeados e castanhos até coloração quase completamente preta. A área de ocorrência de *B. jararaca* no Brasil, estende-se da região central da Bahia para o sul, até o Rio Grande do Sul (CAMPBELL; LAMAR, 2004). No sudeste do Brasil, *B. jararaca* está distribuída principalmente no domínio morfoclimático da Mata Atlântica (AB’SABER, 1977). Podem ser encontradas em ambientes englobando áreas de matas, áreas abertas com características de cerrado, áreas cultivadas e ambientes antropizados (SAZIMA, 1992).

As serpentes do gênero *Crotalus* são também importantes sob o ponto de vista epidemiológico, porque apesar de causarem poucos acidentes (7%), esses são geralmente graves. Este gênero inclui aproximadamente trinta espécies de cascavéis (CAMPBELL; LAMAR, 2004). Destas, apenas *Crotalus durissus* ocorre na maior parte da América do Sul. Todas as demais espécies são encontradas no extremo norte da América do Sul, América Central e principalmente México e Estados Unidos. Sua característica mais peculiar é a

presença do chocalho ou guizo na extremidade da cauda. O corpo, apresenta um colorido de fundo castanho claro, com tonalidades variáveis, sobre o qual se destaca uma fileira de manchas dorsais em forma de losangos marrons escuros, marginadas de branco ou amarelo. Habitam os cerrados do Brasil central, as regiões áridas e semi-áridas do Nordeste, os campos e áreas abertas do Sul, Sudeste e Norte. Está representada no Brasil por uma única espécie: *Crotalus durissus*, que tem ampla distribuição geográfica. A situação taxonômica atual é apresentada, por Campbell; Lamar (2004). Segundo estes autores, *Crotalus durissus* é composto por 11 subespécies, as quais na maioria são distinguidas pelo padrão de cor e tamanho e em menor extensão pelas escamas. Diversas descrições de espécies e subespécies, não estão bem definidas (CAMPBELL; LAMAR, 2004). No Brasil, são reconhecidas cinco formas geográficas, três das quais com ampla dispersão territorial: *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* e *Crotalus durissus collilineatus*. *Crotalus d. terrificus*, habita os campos, áreas de Mata Atlântica e matas com Araucária da região sul, sudeste e centro oeste. *Crotalus d. collilineatus*, ocupa as áreas de cerrado, desde Rondônia, Mato Grosso até Minas Gerais, São Paulo e sul da Bahia. *Crotalus d. cascavella* distribui-se pelas áreas secas de caatinga no nordeste brasileiro.

1.3 HISTÓRIA NATURAL DE *Crotalus durissus* E *Bothrops jararaca*

O estudo de história natural trata de aspectos básicos da biologia dos organismos, incluindo o uso de ambiente, alimentação, reprodução e defesa. E permite uma abordagem abrangente sobre as características da vida das espécies enfocadas.

Bothrops jararaca é uma serpente de corpo delgado, terrestre apresentando um tamanho médio de 120 cm de comprimento (SAZIMA, 1992). Possui hábitos noturnos, sendo encontrada principalmente em áreas florestadas (SAZIMA, 1992).

Crotalus durissus, possui porte mais robusto, em relação a *B. jararaca*, e pode atingir até 160 cm. É uma serpente predominantemente noturna. Habita regiões semi-áridas, áreas abertas, florestas de pinheiros, arbustos e savanas (CAMPBELL; LAMAR, 1989). As cascavéis são típicas de áreas abertas e a sua área de ocorrência está em expansão, devido ao desmatamento e aumento de áreas para agropecuária (MARQUES; SAZIMA, 2003).

Em uma comparação feita entre cascavéis e jararacas com dados das entradas de serpentes no Instituto Butantan, SAZIMA (1992) mostrou que na década de 40 a entrada de *B. jararaca* foi de (38,66%) seguida por *C. durissus* (23,56%). O percentual de jararacas e cascavéis era de 1,6:1, contudo na década de 90, este percentual foi mudado 0,84:1, respectivamente. Estes números mais recentes parecem indicar uma tendência de queda para as primeiras, em virtude do desflorestamento contínuo do sudeste do Brasil. O habitat de *B. jararaca*, deste modo, estaria se retraindo enquanto habitats abertos que favoreceriam as cascavéis estariam em expansão (SAZIMA, 1992).

A atividade de serpentes é notoriamente difícil de se obter e o conhecimento de movimentos das serpentes neotropicais é particularmente escasso (SAZIMA,

1992). De um modo geral, no entanto, as serpentes podem apresentar atividade predominantemente diurna ou noturna, mas há espécies que são ativas indistintamente nos dois períodos. A sua atividade pode estar relacionada com procuras de alimento, de parceiro para acasalamento, de locais para desovar (ou parir), ou para controle da temperatura corporal (termorregulação). A atividade de serpentes pode também estar relacionada ao ciclo reprodutivo: os machos ficam mais ativos na época de acasalamento (quando procuram fêmeas para copular) e as fêmeas podem alterar sua atividade quando estão prenhes e durante a vitelogênese (aumento folicular). Fêmeas de *C. durissus* em vitelogênese apresentam um padrão de atividade diurna maior do que as não vitelogênicas. E a porcentagem de alimentos ingeridos (conteúdos estomacais) nestas serpentes durante a vitelogênese é maior do que aquelas não vitelogênicas (SALOMÃO et al., 1995). Cascavéis e jararacas apresentam atividade noturna e a maioria caça durante este período. Todavia, a termorregulação em ambas as serpentes ocorre durante o dia (SALOMÃO et al., 1995; MARQUES; SAZIMA, 2003), sendo interdependentes da presença de sol.

As serpentes *B. jararaca* são ativas durante a maior parte do ano. E fêmeas tendem a ser maiores e mais pesadas do que os machos. Fêmeas grávidas tendem a permanecer escondidas dentro de determinadas áreas e termorregulam em áreas sombreadas. Quanto ao padrão de atividade de locomoção anual, *B. jararaca* apresenta um pico unimodal no verão. As jararacas foram encontradas em atividade a maior parte do ano, de outubro a maio, sendo a maioria observada de novembro a fevereiro, durante a época mais úmida e quente. A atividade ao longo do ano, parece abranger um período de pouca movimentação, passando as serpentes paradas, principalmente em abrigos, durante três meses mais secos e mais frios do ano (junho-agosto), segundo SAZIMA (1988).

A maioria das serpentes caça ativamente, isto, é locomove-se em busca de suas presas. Uma outra tática é a caça de espreita, utilizada principalmente por Viperídeos (Marques; Sazima, 2003).

A dieta de *B. jararaca* é bastante diversificada com preponderância de roedores, na dieta dos adultos (*Nectomys*, *Rattus*, *Cavia* e *Bolomys* sp. outros murídeos) e anfíbios anuros para filhotes (*Hyla* e *Physalaemus*) (SAZIMA, 1992).

Cascavéis são mais ativas entre abril e maio (outono), com um tipo unimodal de atividade, apresentando alimentação intensiva durante o verão e outono (fevereiro á maio). Os filhotes foram observados se alimentando no final de outono até o inverno. As presas desta espécie, consistem predominantemente de roedores (*Cavia*, *Rattus* e *Mus*), e aves (SALOMÃO et al., 1995). Mas lagartos teídeos (*Ameiva*) também podem fazer parte da dieta de cascavéis (ALMEIDA-SANTOS; GERMANO, 1996).

Deste modo, o hábito alimentar de uma mesma espécie pode variar ao longo de sua vida. *B. jararaca* apresenta ontogenia na dieta, com indivíduos jovens alimentando-se de presas ectotérmicas (por ex. anfíbios anuros) e os adultos alimentando-se de presas endotérmicas, sendo principalmente mamíferos (MARQUES et al. 2001). *Crotalus durissus* não apresenta variação ontogenética na dieta e alimenta-se principalmente de mamíferos (SALOMÃO et al.,1995; SANT’ANNA, 1999).

Picos de alimentação precedem a reprodução, no outono e inverno e fêmeas que copularam no outono continuam a se alimentar até a ovulação, na primavera (SALOMÃO et al., 1995). Quando as serpentes estão ativas, podem causar acidentes. Os acidentes ofídicos em maior número foram causados por serpentes com conteúdos estomacais (serpentes alimentadas) especialmente machos (SALOMÃO et al., 1995).

Em relação ao ciclo reprodutivo, *B. jararaca* produz de 12 a 18 filhotes e os nascimentos ocorrem da metade para o final da estação chuvosa (SAZIMA, 1992).

A alimentação de mamíferos consiste de uma tática conhecida como “bote seguido pela trilha da presa” utilizada pela maioria dos viperídeos que comem roedores. Comportamento de engodo caudal é utilizado pelos juvenis. Predadores de *B. jararaca* incluem aves, gambás e serpentes ofiófagas. Táticas defensivas vão da imobilidade e comportamento de escape, ameaça e bote (SAZIMA, 1992).

De um modo geral, as fêmeas parecem ser mais ativas do que os machos, principalmente após a época reprodutiva, uma vez que precisam se alimentar mais para repor a energia investida na reprodução, principalmente em fêmeas vivíparas.

Como são animais ectotérmicos, isto é, sua temperatura corpórea depende da temperatura do ambiente externo, as serpentes precisam por meio do comportamento, manter sua temperatura dentro de amplitudes muito menores que as variações de temperatura do ambiente. Para isso, buscam locais adequados para aquecer ou resfriar, e alteram a posição e a postura do corpo. Diversas atividades biológicas tais como, locomoção, digestão, produção de gametas (espermatozóides e ovos) e desenvolvimento de embriões processam-se mais rapidamente em temperaturas mais elevadas (MARQUES; SAZIMA, 2003).

A biologia reprodutiva de *Bothrops jararaca* é baseada nos trabalhos de Janeiro-Cinquini et al., (1993a; 1993b) e principalmente de Sazima (1989; 1992). Em um de seus trabalhos (SAZIMA, 1992) relatou a ocorrência de fêmeas visivelmente prenhes de novembro a dezembro e de fevereiro a março subsequente. Em serpentes mantidas em cativeiro, os nascimentos foram observados entre janeiro e abril (SAZIMA, 1992). Segundo Sazima (1992) a data de nascimento coincidiria com a estação úmida, de outubro a março, onde ocorreria uma disponibilidade maior de

presas (anfíbios anuros) para os filhotes. Esta atividade de anfíbios decresceria em março, onde a serpente apresenta pouca ou nenhuma atividade. Sazima (1992) presumiu, assim que devido a este fator, haveria pouco crescimento dos filhotes no primeiro ano de vida.

Em machos adultos de *B. jararaca*, Janeiro-Cinquini et al., (1993b) mostraram que há uma variação sazonal de peso e comprimento dos testículos de exemplares das regiões Sul e Sudeste do Brasil. O comprimento e a massa testicular alcançaram o máximo de atividade no verão e o mínimo no inverno. A presença de espermatozóides dentro dos ductos deferentes, foi verificada durante todo o ano. O tamanho mínimo de maturidade sexual do macho, de *B. jararaca* foi em torno de 54 cm (JANEIRO-CINQUINI et al., 1993b). Contudo, trabalhando com uma amostra composta especificamente da região de São Paulo, Travaglia-Cardoso (2001) não encontrou diferenças significativas nas massas dos testículos de *B. jararaca* ao longo do ano.

Um acúmulo de gordura abdominal no inverno foi observado, em todos os indivíduos adultos de *B. jararaca*, sendo provavelmente acumulada e utilizada durante a primavera e o verão, quando a reprodução ocorre (JANEIRO-CINQUINI et al., 1993).

A biologia reprodutiva em cascavéis brasileiras tem sido baseada nos trabalhos de Almeida-Santos; Salomão (1997); Almeida-Santos et al., (1999); Langlada et al., (1994) e Salomão et al., (1995). O ciclo de *Crotalus durissus* é bastante similar ao de outras cascavéis da região temperada com rituais de combate e acasalamentos ocorrendo somente no outono (ALMEIDA-SANTOS et al., 1990) e ovulação presente na primavera. Contudo, as cascavéis brasileiras não hibernam e a vitelogênese parece ser contínua durante o inverno. Combate ritualizado, nesta espécie, tem sido registrado durante o outono (ALMEIDA-SANTOS, et al., 1990), quando foi observado um grande pico de atividade (SALOMÃO et al., 1995) durante

a época de acasalamento, seguida pela formação de um “plug” fisiológico e estocagem de esperma uterina (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997).

Um comportamento denominado “defesa de poliginia pela fêmea” observou-se fazer parte da estratégia reprodutiva de *C.durissus* em cativeiro semi-extensivo, incluindo disputa entre os machos pelas fêmeas, acasalamento outonal, guarda copulatória e obrigatória estocagem de esperma. Como consequência, deste fato podem ser esperados acasalamentos múltiplos dentro de uma mesma estação, levando a uma competição por esperma e múltipla paternidade (ALMEIDA SANTOS et al., 1999).

A constatação de um ciclo sexual bienal presente nas fêmeas de cascavéis, na região sudeste, foi observada em cativeiro por Langlada (1972). Melgarejo (2003) obteve ninhadas de 6 a 22 filhotes de cascavéis, no Instituto Vital Brazil. Segundo este autor, aqueles nascimentos ocorreram mais precocemente que em *Bothrops*, geralmente entre dezembro e fevereiro.

A espermatogênese nos machos de cascavéis inicia-se em setembro, na primavera, com pico em janeiro, no verão (SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2002). Nesse trabalho, foi descrita a regulação via eixo hipotalâmico - hipofisário-gonadal, pelo qual a hipófise controla por meio de gonadotrofinas a produção de testosterona pelas células de Leydig durante a espermatogênese. E o tamanho corpóreo mínimo de machos em maturidade sexual, foi de 56 cm.

Durante a época reprodutiva as cascavéis são bastante ativas, sendo muito capturadas, principalmente, porque utilizam o chocalho, como advertência, quando são encontradas ou manuseadas. Estudos com cascavéis de região temperada, mostram que dificilmente estas serpentes partem para um ataque, utilizando todo um repertório comportamental antes do bote ser efetuado. Durante episódios de

predação, observados entre *Didelphis marsupialis* (gambá) e cascavéis, Almeida-Santos et al., (2000) observaram que as cascavéis utilizam a imobilidade, como a principal “arma” de defesa contra o inimigo. E somente quando atacadas, elas revidam e desferiam botes. A mordida e o bote são usados quando o confronto com o predador é inevitável. Em um estudo sobre *B. jararaca* na natureza, o bote desferido contra humanos foi registrado em apenas 10% dos encontros. Além disso, características como a camuflagem e a imobilidade em jararacas, podem dificultar a sua visualização e assim facilitar os acidentes ofídicos (MARQUES; SAZIMA, 2003). Contrariamente, cascavéis são mais fáceis de serem localizadas devido ao ruído de seu guizo e portanto causam relativamente poucos acidentes.

1.4 OBJETIVOS

Nesse estudo, discutem-se as estratégias reprodutivas empregadas pelas serpentes viperídeas *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca*. Para a investigação dessas estratégias, descreve-se a morfologia e aspectos da morfofisiologia dos aparelhos reprodutores, em ambos os sexos, bem como características da estocagem de esperma e da viviparidade.

1.4.1 Objetivo geral

Delinear estratégias reprodutivas para as serpentes dos gêneros *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus* no Estado de São Paulo e verificar se tais estratégias constituem um modelo para os crotalíneos.

1.4.2 Objetivos específicos

Estudos Macroscópicos:

- Caracterizar a morfologia e a morfofisiologia do aparelho reprodutor dos machos e fêmeas de *C. durissus* e *B. jararaca*;
- Determinar e comparar as estratégias reprodutivas utilizadas por fêmeas de ambas as espécies com base em variação anual do comprimento dos folículos ovarianos, fecundidade, massa relativa da ninhada, e dimorfismo sexual;

- Determinar e comparar o número, massa e comprimento corpóreos dos filhotes de ambas as espécies.
- Determinar e comparar as estratégias reprodutivas utilizadas por machos de ambas as espécies tendo por base parâmetros como: comprimento dos testículos, diâmetro dos ductos deferentes e dimorfismo sexual de tamanho relativo dos tratos reprodutivos;
- Caracterizar e reconhecer as estruturas envolvidas na estocagem de esperma tanto em machos como em fêmeas de cascavéis e jararacas;
- Descrever as membranas fetais e seu comportamento anatômico em cascavéis e jararacas;
- Caracterizar o tipo de placenta que ocorre em ambas às espécies.

Estudos Microscópicos:

- Caracterizar aspectos histológicos e de ultra-estrutura dos aparelhos reprodutores de machos e fêmeas de cascavéis e jararacas;
- Determinar aspectos histoquímicos das células do aparelho reprodutor feminino nas regiões do ovário e oviduto (útero e vagina) e aparelho reprodutor masculino compreendendo especificamente os ductos deferentes de ambas as espécies.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DIVERSIDADE ESTRUTURAL DO OVIDUTO REPTILIANO

O oviduto reptiliano é um órgão fascinante e suas funções múltiplas refletem a variedade dos modelos reprodutivos exibida por diversos grupos de animais (GIRLING, 2002)

A estrutura ovidutal e a sua função estão diretamente relacionadas ao modo de paridade, ou ao método de provisão de nutrientes para os embriões de répteis (GIRLING, 2002). No contexto desta explanação, a oviparidade é definida como postura de ovos contendo embriões que requerem um período de desenvolvimento fora do trato reprodutivo das fêmeas (GUILLETTE, 1993). E a viviparidade, por outro lado, é definida como a retenção do embrião dentro do útero da mãe até o desenvolvimento estar completo e o nascimento ocorrer (GUILLETTE, 1993).

As funções do oviduto reptiliano incluem: produção de albúmen, produção da casca do ovo, placentação, ovipostura ou parturição e estocagem de esperma, dependendo do modo de paridade da espécie enfocada. Estas funções estão sob controles fisiológicos complexos e muitos detalhes ainda estão longe de serem totalmente compreendidos. Logo, o objetivo desta revisão é sumarizar as informações disponíveis acerca da estrutura e função dos ovidutos reptilianos, particularmente, sobre o do desenvolvimento do ovo amniótico (oviparidade e viviparidade), as relações tróficas materno-fetais (placentação) e a estocagem de esperma. Quanto ao modo de paridade, será enfatizada a viviparidade em serpentes, enfocando-se principalmente o aparelho reprodutor de viperídeos.

2.2 SURGIMENTO DO OVO AMNIÓTICO

Após a colonização da terra foi necessário que os primeiros vertebrados desenvolvessem ovos capazes de sobreviver fora da água. As adaptações resultantes destas pressões são o âmnio e o alantóide, o primeiro presumivelmente traz para o embrião o seu próprio “mar”, o último, agindo inicialmente como um repositório de produtos excretórios, é um órgão para troca de gases (WOODING; FLINT, 1994).

O ovo dos répteis é posto em terra; assim, está evitada a necessidade de uma adaptação para a vida aquática, tanto no filhote como no adulto. A casca do ovo oferece proteção. Uma grande quantidade de vitelo fornece alimento em abundância, de modo que o filhote do réptil, diferente do girino de anfíbio, pode eclodir com um tamanho razoável, já como uma réplica em miniatura do adulto e, assim, não tem necessidade de sair prematuramente à procura de alimento. Dos anexos embrionários desenvolvidos no interior da casca do ovo, um recobre o embrião e o vitelo. Um segundo tem a função de pulmão, para a captação do oxigênio que penetra pela casca porosa. Um terceiro anexo o âmnio, que dá o nome do tipo do ovo, envolve um espaço cheio de líquido onde se encontra o embrião. Este espaço líquido é uma réplica em miniatura do lago ancestral. O desenvolvimento deste novo tipo de ovo foi um passo muito importante na evolução dos vertebrados terrestres. Assim os répteis juntamente com as aves e os mamíferos, que deles aparentemente descenderam, são todos denominados freqüentemente de amniotas (ROMER; PARSONS, 1985).

O desenvolvimento das membranas extra-embrionárias providenciou um meio para a captação de nutrientes e troca de gases e conseqüentemente ocorreram modificações nos ovidutos dos primeiros Squamatas. Alguns estudos (GUILLETTE; JONES, 1985; STEWART, 1985) têm demonstrado que não há diferenças consistentes entre ovos típicos de

Squamatas ovíparos ou vivíparos, em relação ao arranjo topográfico das membranas extra-embriônicas.

2.3 EVOLUÇÃO DA VIVIPARIDADE

Por mais de um século, biólogos consideraram que estudos dos Squamatas poderiam providenciar maior compreensão na evolução da viviparidade. Estas considerações foram iniciadas pelos estudos de Giacomini (1891); Harrison; Weekes (1925), entre outros. No início, dentre as publicações relacionadas primariamente à viviparidade, destacavam-se quatro tipos: documentação de hábitos de reprodução de filhotes paridos vivos e ciclos reprodutivos; análises da associação do modo reprodutivo e habitat; estudos experimentais e histológicos relacionados ao controle endocrinológico da reprodução e estudos da morfologia das membranas placentárias e do oviduto. Mais recentemente, apareceram os trabalhos em serpentes do gênero *Thamnophis* (colubrídeo) feita por Loren Hoffman, incluindo os primeiros estudos de placenta e oviduto, utilizando-se a microscopia eletrônica de transmissão (HOFFMAN, 1970; HOFFMAN; WINSATT, 1972).

Assim sendo, no final de 1960 a viviparidade já havia sido bem documentada em numerosas espécies de escamados, bem como as funções básicas dos ovidutos e das membranas placentárias. Em adição, apesar da viviparidade e placentação terem sido consideradas evoluírem conjuntamente e progressivamente (WEEKES, 1935; PACKARD et al., 1977), o escasso suporte empírico para este cenário evolutivo aparentemente não foi demonstrado (BLACKBURN, 1995). Em virtude disso, desacordos existentes acerca de habitats nos quais a viviparidade tenha surgido e como se operavam as pressões seletivas, bem como a sequência pela quais estas adaptações placentárias evoluíram, permaneceram duvidosas até agora (WEEKES, 1930; BAUCHOT, 1965).

A viviparidade é hipotetizada ter evoluído nos répteis Squamatas em 100 ocasiões (BLACKBURN, 1982; SHINE, 1985). Contudo, nos crocodilianos, tartarugas e sphenodontes, todas as espécies são ovíparas. Fatores concernentes à evolução da viviparidade em répteis têm sido bastante debatidos (SHINE; GUILLETTE, 1988; SHINE, 1985; GUILLETTE, 1993; BLACKBURN, 1995). Alguns autores têm sugerido que a evolução da viviparidade envolveu pressões seletivas agindo na variabilidade fenotípica da retenção do ovo, nos animais em ambientes extremados retendo assim seus ovos nos ovidutos por períodos progressivamente mais longos (GUILLETTE, 1982; SHINE; GUILLETTE, 1988). O concomitante adelgaçamento da casca para permitir as trocas gasosas, acompanhadas pelo aumento da secreção materna de nutrientes, eventualmente levou ao caminho da oviparidade e deste à viviparidade (BLACKBURN, 2000).

A origem etimológica do termo viviparidade é latina, “*vivus pario*”, significando parir vivo. Dentre todas as ordens, apenas os Squamata, (escamados) exceto a subordem Sphenodontia, adquiriram estágios de transição entre a oviparidade e a viviparidade, sendo que aproximadamente um quinto de todas as espécies de lagartos, serpentes e anfisbênias são vivíparas (WEEKES, 1935; SHINE, 1985). Muitos dos escamados ovíparos estudados retêm ovos *in utero* por mais da metade do período de embriogênese, o que sugere uma tendência à substituição do processo ovíparo pelo vivíparo (SHINE, 1985). A viviparidade crescente trouxe vantagens adaptativas para que algumas espécies se desenvolvessem em climas hostis às espécies ovíparas, como as regiões de altitude elevada e as desérticas (SHINE, 1985). Durante a evolução, muitas espécies gradualmente passaram a reter, por cada vez mais tempo, os ovos no interior dos ovidutos, propiciando o desenvolvimento das relações nutricionais materno-fetais, culminando com a condição de viviparidade.

Contudo, a viviparidade não está uniformemente distribuída entre as linhagens dos Squamata, apresentando muitas variações nas proporções de espécies vivíparas (FRAIPONT,

et al., 1996). Esta observação suporta a hipótese de que pressões seletivas e pré-adaptação variam nos níveis taxonômicos superiores (BLACKBURN, 1985). Deste modo, ambos os processos de oviparidade com retenção do ovo, e de viviparidade algumas vezes ocorreram juntas na mesma linhagem, sugerindo uma possível relação entre a evolução da viviparidade e retenção do ovo (SHINE; BULL, 1979; GROSS; SHINE, 1981; SHINE; GUILLETTE, 1988; SHINE, 1985). Embora alguns trabalhos tenham considerado a evolução da viviparidade em escamados (BLACKBURN, 1982; GUILLETTE et al., 1980; SHINE, 1985; SHINE; BULL, 1979; TINKLE; GIBBONS, 1977) poucos têm discutido a evolução da retenção dos ovos (SHINE; GUILLETTE, 1988). Destes estudos duas hipóteses específicas têm sido sugeridas. A primeira hipótese é que a retenção do ovo pode ser considerada como alternativa para a viviparidade (FITCH, 1970; PACKARD et al., 1977). A segunda hipótese é que a retenção do ovo pode ser um passo intermediário na evolução da viviparidade (SHINE; BULL, 1979). Esta hipótese é suportada pela elevada frequência de espécies vivíparas em “táxon” contendo espécies que retém ovos, especialmente em serpentes, e pela aparente tendência para prolongar a retenção dos ovos uterinos em escamados que incubam ovos (SHINE, 1985). Fitch (1970), propôs uma transição evolucionária de oviparidade sem reter ovo para viviparidade (O—V) ou de oviparidade sem retenção do ovo para oviparidade com retenção de ovo (O—G). Shine; Bull (1979), propuseram um cenário alternativo sugerindo a sequência evolucionária da oviparidade sem reter ovo para oviparidade com retenção do ovo e então viviparidade (O—G—V).

Duas análises independentes (BLACKBURN, 1982, 1985; SHINE, 1985) concluíram que a viviparidade ocorreu mais de 90 vezes entre répteis. As origens da viviparidade estão distribuídas em todas as maiores zonas biogeográficas ocupando níveis taxonômicos de família e super família para a subespécie (BLACKBURN, 1982). Algumas origens

reconhecidas datam do Mesozóico por exemplo: mosasaurios e ichthyosaurios enquanto outras representam eventos do Plioceno ou Pleistoceno (BLACKBURN, 2000).

O maior benefício da análise filogenética é que ela permite inferências acerca de parâmetros biológicos e ecológicos sob os quais a viviparidade deve ter se originado. Shine (1985) em uma importante monografia, analisou as condições ecológicas, e concluiu que a maior parte das origens da viviparidade, ocorreu em climas frios de latitudes e altitudes altas. Uma das explicações é que fêmeas vivíparas podem termorregular seus ovos em função do seu comportamento, protegendo-os contra o frio e acelerando assim a sua taxa de desenvolvimento. Esta conclusão geral tem recebido suporte de uma variedade de estudos experimentais e descritivos (SHINE, 1983; QUALLS et al., 1997). Contudo, esta hipótese, tem sido contestada para *Sceloporus* (GUILLETTE et al., 1980) baseando-se na distribuição atual desta espécie. Em virtude disso, provavelmente uma simples correlação de parâmetros reprodutivos e ecológicos possa ser insuficiente para indicar os ambientes nos quais a viviparidade tem se originado (BLACKBURN, 2000). Assim, reconstruções filogenéticas detalhadas e estudos experimentais podem no futuro revelar de fato como a viviparidade se originou.

Após a ovulação, os ovos dos amniotas caminham dentro do oviduto tubular derivado do ducto Mülleriano embrionário (WAKE, 1985; MOSSMAN, 1987). Durante esta passagem, o ovo é fertilizado e vários envoltórios são depositados pelo oviduto. O tempo em que o ovo permanece no oviduto variam entre as espécies (STEWART; THOMPSON, 2000).

Blackburn (1994) criticou o termo ovoviviparidade em répteis e anfíbios por ser muito ambíguo, e aplicado a uma variedade de modelos reprodutivos que tem pouca coisa em comum. Assim, nesta linha (BLACKBURN, 2000), propôs uma classificação bipartida que distingue totalmente dois parâmetros reprodutivos: a origem dos nutrientes para o desenvolvimento e o estado do produto reprodutivo depositado pela mãe. Oviparidade e

viviparidade seriam então utilizadas em sentido literal reprodutivo como “botar ovos” e “parir vivo”. A “Lecitotrofia” refere-se à provisão de nutriente para embriões via ovo (vitelo) e “Matrotrofia” para provisão por meios alternativos por ex: (placenta ou placentotrofia), nutrição obtida da mãe (STEWART; THOMPSON, 2000). O uso destes termos possui diversas vantagens, incluindo a eliminação da confusão associada ao termo arcaico de “ovoviparidade” (SHINE, 1985; BLACKBURN, 2000). Deste modo, os répteis seriam caracterizados principalmente pela fonte de nutrientes para o seu desenvolvimento embrionário.

Embriões dos amniotas diferem dos não amniotas pela presença de quatro anexos, membranas extra-embrionárias, que servem como uma interface entre o embrião e o seu ambiente (STEWART; THOMPSON, 2000). Estes tecidos, o córion, âmnion, alantóide e o saco vitelino são características de amniotas ovíparos e vivíparos. Todas as provisões de nutrientes pós- ovulatório ao embrião são transferidas do oviduto através de pelo menos uma das membranas extra-embrionárias (LUCKETT, 1977; WAKE, 1985; STEWART, 1997).

A relação estrutural entre o oviduto e as membranas extra-embrionárias evoluiu para um quinto anexo embrionário chamado de placenta, a qual é definida como uma íntima justaposição ou fusão dos órgãos fetais ao tecido materno para trocas fisiológicas (MOSSMAN, 1937). A característica de nutrição embrionária na qual o nutriente é transferido através da placenta é a placentotrofia (WOURMS, 1981; BLACKBURN et al., 1985), que ocorre em somente dois grandes “clades” dos amniotas existentes, Synapsida e Lepidosauria, da ordem Squamata: anfisbenídeos, lagartos e serpentes, sendo de interesse devido à prevalência de extensa gestação intra-uterina e das numerosas origens evolucionárias da viviparidade (STEWART; THOMPSON, 2000).

2.4 ESTRUTURA DA PLACENTA

A placentação é encontrada entre vertebrados nos quais a fêmea retém seus ovos a termo e dão a luz a seus filhotes.

Nos ovos de escamados, o corioalantóide reveste o hemisfério dorsal do ovo. A maior diferença é que no ovo dos ovíparos a casca é relativamente forte e o ovo de vivíparo tem uma delgada membrana. O útero não gravídico é um tubo convoluto com paredes delgadas e um lúmen colapsado. O ovo distende tanto o útero, que o tecido externo do ovo virtualmente fica em contato com o revestimento interno uterino. Isto porque a casca do ovo em volta do ovo vivíparo é tipicamente fina ou desaparece, e o revestimento uterino é estreitamente justaposto com as membranas extra-embriônicas. Os resultados são ajustes que reúnem o critério estrutural e presumivelmente também funcional de Mossman (1937). Assim se define o termo *placenta* como “Uma íntima aposição ou fusão do órgão fetal para o tecido fetal e para o maternal objetivando trocas fisiológicas”. Logo, a justaposição do útero com o corioalantóide, constituem a alantoplacenta (BLACKBURN, 1993). A placentação corioalantóica parece ser uma consequência necessária e correlata da viviparidade em Squamatas. Dada a necessidade de troca de gases pelos ovos no oviduto, como também a aposição do corioalantóide e útero e a delgada membrana da casca, uma alantoplacentação funcional parece ser um aspecto comum em escamados vivíparos (BLACKBURN, 1993). A associação entre epitélio coriônico e o epitélio uterino, na placentação corioalantóica varia desde uma simples aposição celular materno-fetal até aquelas formas mais complexas nas quais capilares fetais e maternos aproximam-se profundamente em camadas atenuadas WODDING; FLINT, (1994). A célula coriônica (trofoblasto) é capaz de considerável absorção endocitótica (WODDING; FLINT, 1994).

A alantoplacenta em lagartos e serpentes se forma durante a evolução da viviparidade através da oposição do corioalantóide e um vestígio da membrana da casca em contato com o revestimento uterino (BLACKBURN, 1993a). Esse tipo de placenta geralmente em escamados são epiteliocoriais, difusas, indecíduas e altamente vascularizadas; acompanhadas de trocas de gases materno- fetais e possivelmente de quantidades de nutrientes orgânicos e inorgânicos. A troca de gases presumivelmente é aumentada pelo afinamento do tecido que permanece entre capilares fetais e maternos (BLACKBURN, 1993a).

Na década de 40, no Brasil, um estudo sobre estruturas histológicas (ovarianas e uterinas), mostra pela primeira vez, a relação entre o epitélio uterino e as membranas coriônicas em cascavéis e jararacas, denominando-as de placenta (FRAENKEL; MARTINS, 1939). Posteriormente, Biasi (1986) em um estudo de parasitas sanguíneos, relata a transmissão congênita de hematozoários nos últimos estágios de prenhez (30 a 37 da escala de Zehr), em *Bothrops* e *Crotalus*. Os hematozoários passaram da mãe infectada para os filhotes confirmando, deste modo, a relação entre a circulação materna e fetal em ambas às espécies.

Placentas especializadas, no entanto, que transferem grandes quantidades de nutrientes, foram encontradas nos gêneros de lagartos *Chalcides*, *Mabuya* e *Pseudemoia*. As placentas destas espécies, possuem áreas especializadas, como a presença de interdigitações e hipertrofia dos tecidos uterinos e corioalantóicos. O lagarto *Mabuya*, sul americano, é mais especializado ainda, e apresenta um distinto placentoma (BLACKBURN, 1993a).

2.5 DIVERSIDADE ESTRUTURAL DA PLACENTA DOS SQUAMATAS

Baseado nos componentes fetais, seis tipos de placentas distintas podem ser identificados de acordo como sua contribuição extraembrionária (BLACKBURN, 1998; STEWART; THOMPSON, 2000;): *alantoplacenta* ou *placenta corioalantóide* que é formada

pela justaposição do corioalantóide e a mucosa uterina (PANIGEL, 1951; BLACKBURN, 1993a), *placenta coriovitelina* que se forma fora da membrana coriovitelina trilaminar (BLACKBURN, 1998), *onfaloplacenta* a qual se desenvolve da onfalopleura não vascular da massa de vitelo isolada, e é uma especialização dos Squamatas (BLACKBURN, 1998) e a *placenta onfalantóide* que se forma através da justaposição do alantóide à face interna da massa de vitelo isolada com sua onfalopleura (STEWART; BLACKBURN, 1988; STEWART, 1993). Em resumo, seis categorias distintas de placenta são encontradas em escamados, três destas não são vascularizadas no lado fetal (onfaloplacenta, corioplacenta, e placenta bilaminar do saco vitelínico) e três se formam temporariamente durante o início do desenvolvimento (corio placenta, placenta coriovitelina e placenta bilaminar do saco vitelínico) segundo, Blackburn (1998). Dada a diversidade de tipos placentários existentes entre os Squamatas, a alantoplacenta não pode ser considerada como uma placenta definitiva ou exclusiva (BLACKBURN, 1998). Apesar de todas as categorias placentárias poderem ser definidas anatomicamente, não está claro em que extensão cada uma acompanha as trocas fisiológicas entre tecidos maternos e fetais.

A alantoplacenta presumivelmente tem como função a troca de gases, desde a sua formação até o final da gestação (PANIGEL, 1951; YARON, 1985; BLACKBURN, 1993a). A placenta coriovitelina é transitória e a performance de sua função é no início do desenvolvimento, isto é antes do estabelecimento do corioalantóide (STEWART; BLACKBURN, 1988).

Os primeiros estudos da diversidade da placentação entre répteis escamados está contida em uma série de trabalhos de WEEKES (1927; 1929; 1930). Weekes (1935) em um trabalho final sumarizou a descrição morfológica da placentação de mais de 30 espécies de lagartos e serpentes e definiu 3 classes de diversidade placentária baseada em características distintas da alantoplacentação. As características primárias destes “morfotipos” incluem: **Tipo**

I - aposição íntima dos sistemas vasculares do embrião e da mãe, sendo que os epitélios uterinos e coriônicos são formados por células delgadas e escamosas, a membrana corioalantóide está envolvida ao redor do embrião por pregas da parede uterina. Estas pregas ocorrem em algumas áreas restritas do hemisfério embrionário, principalmente sob os principais vasos uterinos onde a artéria do cordão umbilical direita e a veia umbilical alcançam a membrana alantóide externa. **Tipo II** - vasos uterinos permanecem elevados em pregas justapostas por grandes células epiteliais coriônicas.

Tipo III - existe uma área de formação elíptica adjacente ao útero, o mesométrio, que contém pregas uterinas vascularizadas e grandes células epiteliais uterinas e coriônicas. Weekes, (1929;1930) também descreveu a placenta do saco vitelínico dos répteis, mas não incorporou esta estrutura dentro de seu sistema de diversidade placentária (WEEKES, 1935). Até recentemente, todas as placentas novas descritas têm sido caracterizadas como do Tipo I. No entanto, a descoberta, de uma alantoplacenta especializada numa espécie neotropical de lagarto do gênero *Mabuya* (BLACKBURN et al., 1984; BLACKBURN; VITT, 1992), levaram à expansão do sistema de Weekes (1935) incluindo uma quarta categoria (Tipo IV), segundo Blackburn (1993a). Semelhante ao Tipo III, as alantoplacentas do **Tipo IV** - são caracterizadas pela presença de uma modificação regional da placenta corioalantóica adjacente ao mesométrio (BLACKBURN et al., 1984). O termo placentoma tem sido aplicado a estas estruturas (BLACKBURN, et al., 1985). O placentoma da alantoplacenta do tipo IV contém pregas vilosas do contorno uterino, isto é o endométrio, que se projetam profundamente dentro da invaginação da membrana corioalantóica. Células do epitélio uterino são cúbicas e contém microvilos. O epitélio coriônico contém dois tipos de células, células grandes binucleadas com microvilos e células colunares binucleadas. O epitélio coriônico é formado por um forte tecido conjuntivo, contendo vasos sanguíneos, leucócitos e macrófagos.

Como correntemente têm sido reconhecidos, existem 3 espécies de lagartos com alantoplacenta tipo IV pertencente ao gênero *Mabuya*, e 2 lagartos pertencente aos gêneros *Chalcides* e *Pseudemoia* com o tipo III de placentação (WEEKES, 1935; BLACKBURN, 1993b; THOMPSON; STEWART, 1994). Por outro lado, a existência do tipo II concebido por Weekes (1935) tem sido questionada (STEWART; THOMPSON, 1994). A maior parte das espécies de lagartos placentários pertence à família Scincidae e com poucas exceções, todos os outros escamados vivíparos tem o tipo I de alantoplacenta (YARON, 1985; BLACKBURN, 1993a).

2.6 ESTOCAGEM DE ESPERMA

A existência de estocagem de esperma, a partir de observações de fêmeas de vertebrados que pariram após longo tempo de isolamento de machos, tem sido muito discutida na literatura (FOX, 1977; BIRKHEAD; MOLLER, 1993).

Dentre os peixes, espécies vivíparas estocam esperma por quase um ano (FOX, 1956), enquanto algumas salamandras apresentam fertilização retardada utilizando-se de esperma estocado desde algumas horas até um período de dois anos (ZUG, 1993). Aves estocam esperma nos ovidutos de 6 a 117 dias (BIRKHEAD; MOLLER, 1993) da mesma forma que mamíferos. Neste táxon Kumari et al., (1990); Birkhead; Moller (1993) relataram a existência de estocagem em marsupiais (0,5 a 16 dias), morcegos (16 a 1988 dias), lagomorfos (1 a 30 dias), roedores (0,5 a 23 dias), carnívoros (5 a 11 dias), ungulados (2 a 6 dias) e primatas (5 dias).

A estocagem de esperma também tem sido documentada em répteis, tais como, tartarugas e terrapinas (3 a 49 meses) segundo Gist e Jones (1989); Birkhead; Moller, (1993); lagartos (1 a 18 meses); Kumari et al., (1990) crocodilianos (cerca de sete dias) e em

Rhynchocephalia (cerca de seis meses) (BIRKHEAD; MOLLER, 1993). Desse modo, se percebe quão bem distribuído é esta característica em vertebrados.

Estocagem de esperma no oviduto reptiliano tem sido reportado em muitas espécies de lagartos, serpentes e tartarugas (FOX, 1956, 1963; SAINT-GIRONS, 1975; FOX 1977; HALPERT et al., 1982; GIST; JONES, 1987; PALMER; GUILLETTE, 1988). Muitos relatos inferem a ocorrência de estocagem de esperma, em répteis, a partir da observação de fêmeas que em cativeiro dão origem a filhotes após longos períodos de isolamento.

Retenção de esperma no trato reprodutivo de serpentes fêmeas relaxa o requerimento para o envolvimento direto do macho na fertilização e subseqüentemente para a presença de ovos ovulados (SCHUETT, 1992).

Em serpentes de região temperada e tropical, o armazenamento de esperma no oviduto, particularmente no útero, é um importante mecanismo, pois permite o lapso entre a cópula de outono e a fertilização de primavera, de modo que os nascimentos ocorram numa estação do ano mais favorável no que diz respeito à temperatura e às chances de obtenção de alimento (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO 1997; SCHUETT, 1992). Estocagem de esperma pode também ser vantajosa, porque ela aumenta o período reprodutivo disponível para as fêmeas, contribui para a competição de esperma e múltipla paternidade em uma única ninhada (BIRKHEAD; MOLLER, 1993; SCHUETT, 1992) além de reduzir o risco de predação pela redução da frequência da cópula, assegurando o encontro do parceiro em lugares com densidade baixa ou movimentos lentos (BIRKHEAD; MOLLER, 1993). Outra vantagem da fertilização retardada é a possibilidade de fertilização de várias séries de folículos, independentemente da época do ano na qual a fêmea tenha copulado (CARSON, 1945; MARQUES, 1996; TRYON, 1984).

Regiões de estocagem de esperma aparecem ser restrita à vagina anterior e à região anterior do oviduto. Estocagem de esperma na vagina anterior tem sido reportada para

diversas espécies reptilianas (CUELLAR, 1966; HALPERT et al., 1982). Regiões para estocagem de esperma são sempre formados de criptas entre as dobras da mucosa da vagina (HALPERT et al., 1982). Estocagem de esperma também tem sido notada no infundíbulo (incluindo a tuba uterina) em lagartos (CUELLAR, 1966). Em *Seminatrix pygaea* (Colubrídeo) esperma foi encontrado em glândulas no infundíbulo posterior, incluindo a tuba uterina (SEVER; RYAN, 1999). A histologia desta região de estocagem não difere dos tecidos adjacentes. As similaridades entre os túbulos que carregam e não carregam esperma sugerem que esta pode ser fortuita (GIRLING, 2002). Gist; Jones (1987), relataram que estruturas de estocagem de esperma são caracteristicamente não especializadas, exceto, no caso da presença de esperma. Apesar da morfologia das estruturas de estocagem de esperma poder não diferir daquelas do restante do oviduto, diferenças bioquímicas e fisiológicas podem tomar parte na manutenção do esperma. Na maioria dos trabalhos disponíveis, espermatozóides são descritos em grupos, ou em locais de estocagem, sem associação direta com os tecidos ovidutais (FOX, 1963; GIST; JONES, 1989). Contudo, em um lagarto *Holbrookia propinka*, o esperma é considerado estar diretamente associado ou parcialmente embebido ao tecido ovidutal. E em outro lagarto lacertídeo, alguns espermatozóides foram notados nos espaços intercelulares (GIRLING, 2002). Isto sugere que na maioria dos casos, principalmente o oviduto pode secretar alguma substância associada com a manutenção do esperma (GIRLING, 2002).

2.7 APARELHO REPRODUTOR FEMININO DE SERPENTES

Do ponto de vista anatômico e morfológico, o sistema reprodutor das fêmeas de serpentes é constituído por dois ovários e dois ovidutos dispostos assimetricamente em termos de simetria bilateral. Os ovidutos abrem-se na cloaca unindo-se parcialmente nas adjacências

da vagina bilobada, tanto em *Bothrops* (GOMES; PUORTO, 1993) como em *Crotalus* (LANGLADA et al., 1994; GHELMAN, 1998). As formas das vaginas parecem ser diferenciadas nas espécies estudadas, sob o ponto de vista anatômico, contudo esta observação carece de um exame mais cuidadoso.

Ambas as espécies de serpentes (*C. durissus* e *B. jararaca*) apresentam um ciclo reprodutivo aparentemente bienal (LANGLADA, 1972; SAZIMA, 1992). Este lapso de tempo observado durante o ciclo está relacionado, aparentemente, à capacidade de armazenar gordura na cavidade abdominal, visando à reprodução (BLEM, 1982). Como os répteis dependem da gordura armazenada para efetuarem seus ciclos de reprodução (FITCH, 1960; BROWN, 1991) este parâmetro parece ser o mais utilizado para inferir a duração dos ciclos reprodutivos em serpentes (BLEM, 1982; NAULLEAU; BONNET, 1996; NAULLEAU et al., 1999).

Os ciclos reprodutivos em serpentes fêmeas podem ser caracterizados também pela época do desenvolvimento folicular. Dessauer; Fox (1959) definiram a vitelogênese secundária como a fase em que ocorre um rápido aumento de massa de folículos ovarianos, sendo decorrente do acréscimo de íons, sais minerais e vitelo. A estrutura dos ovários e as trocas sazonais, observadas durante a vitelogênese (crescimento folicular), em ambas as espécies aqui estudadas, são motivo de controvérsias. Ademais não se sabe, ao certo, quando os folículos ovarianos aumentam de tamanho e qual a relação entre a gordura da cavidade abdominal; vitelogênese e o acasalamento. A relação entre os três fatores antes citados tem sido motivo de grandes discussões nos trabalhos mais recentes (ISOGAWA; KATO, 1995; SCHUETT, 1992; NAULLEAU et al, 1999). Outro fator importante estudado em reprodução de serpentes é a fecundidade, em virtude de se poder calcular o investimento reprodutivo da espécie.

A fecundidade de serpentes é analisada, geralmente, por dois parâmetros: frequência de reprodução e relação entre a massa da ninhada e da fêmea (“relative clutch mass” = RCM) (PARKER; PLUMMER, 1987). A massa relativa da ninhada (MRN) é um dos aspectos mais estudados da história natural de serpentes e de sua reprodução. O esforço reprodutivo é um parâmetro que reflete a quantidade de reservas utilizada para a produção de filhotes. A massa relativa da ninhada (MRN), bem como o número e tamanho dos filhotes produzidos, são medidas diretas do esforço reprodutivo em serpentes.

Em serpentes, a fecundidade está diretamente relacionada ao tamanho corpóreo (FITCH, 1970; SHINE, 1994). Apesar disso o índice de fecundidade expressado por número de folículos; ovos ou filhotes, nunca foi observado comparativamente entre *C. durissus* e *B. jararaca*.

A divisão anatômica do oviduto de serpentes, também tem gerado muitas dúvidas, pois alguns autores, dentre eles Rahn; Ludwig (1943), consideraram que a vagina anterior está em contigüidade com o útero. Aldridge (1992) achou os termos vaginas anteriores, dados por (RAHN; LUDWIG, 1943) inapropriado, sob o ponto de vista morfológico e funcional já que o hemipênis pode não penetrar nessa região.

Outros autores, como Fox (1977) descreveram o útero possuindo tecidos marcadamente delimitados, sob o ponto de vista histológico, relativamente ao restante do oviduto. Todavia, alguns trabalhos de anatomia, ainda designam os ovidutos de um modo geral, não especificando os limites de suas estruturas ou compartimentos (LÉCURU-RENOUS; PLATEL, 1970; GOMES; PUERTO, 1993).

Trabalhos recentes, entretanto, já mostram divisões do oviduto em infundíbulo, útero e vagina (LANGLADA et al, 1994; ABDALLA, 1994). Outros autores têm caracterizado a região uterina com grande desenvolvimento muscular; estando adaptada para a parturição e nascimento (YOKOYAMA; YOSHIDA, 1994). Abdalla (1994), observou

hipertrofia muscular em úteros desenvolvidos de *B. jararaca* caracterizando no oviduto quatro porções anátomo - histológicas bem evidenciadas, ou seja, o infundíbulo, tuba uterina, útero e vagina. Ghelman (1998), também caracterizou nos ovidutos de *Crotalus durissus* três regiões anatômicas distintas: a tuba uterina, útero e vagina.

2.8 APARELHO REPRODUTOR MASCULINO DE SERPENTES

Os machos de *C. durissus* e de *B. jararaca* apresentam dois testículos alongados, que se comunicam bilateralmente com a cloaca através dos respectivos ductos deferentes.

O epidídimo está intimamente conectado com o testículo, do mesmo lado e permanece ao longo da margem dorsal e superfície medial do testículo em *Vipera berus* e *Tropidonotus natrix* (VOLSOE, 1944). Os ductos eferentes dirigem-se do testículo para o epidídimo, distribuindo-se ao longo de todo o comprimento do testículo (VOLSOE, 1944). Como nos testículos descritos em aves (ORSI, 2000), em serpentes não há caracterização epididimal em cabeça, corpo e cauda. A eventual presença de funículo espermático, tampouco foi investigada em *Crotalus* ou *Bothrops*.

Em serpentes, os aumentos do volume das gônadas e ductos extragonadaís estão correlacionados com a evolução da espermatogênese durante o ciclo reprodutivo (FOX, 1977). Em *C. durissus* os ductos deferentes, contém um número maior de espermatozóides durante a época reprodutiva (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004). Esta possível estocagem de espermatozóides na luz vasodeferencial poderia estar relacionada à espermatogênese sazonal dissociada da época de cópula (SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2002).

Janeiro-Cinquini et al., (1993 b), observaram espermatozóides presentes nos ductos deferentes durante todo o ano em *B. jararaca*. Contudo, um acompanhamento morfométrico desses ductos deferentes seria necessário, para saber se há ou não estocagem de esperma

nestas estruturas. Análogo às fêmeas, não se sabe como e por quanto tempo os espermatozóides permanecem viáveis na luz. O conhecimento da época em que ocorre a espermatogênese e a estocagem de esperma nos vasos deferentes, podem determinar o tipo de padrão reprodutivo dos machos.

Os ciclos reprodutivos em machos de serpentes foram categorizados por Saint-Girons (1982) e Schuett (1992) em dois principais Tipos: Tipo I (aestival ou pós-nupcial) e Tipo III (vernal ou pré-nupcial), Para os demais tipos e subtipos, ver Schuett (1992). No Tipo I, a espermatogênese inicia na primavera e finaliza com a espermiogênese no final do verão ou início de outono. Os espermatozóides são estocados no vaso deferente durante todo o inverno. Esta classificação favoreceu a caracterização da espermatogênese e dos ciclos reprodutivos em diversos gêneros de serpentes (ALDRIDGE, 1979a, 1993; ALDRIDGE; DUVALL, 2002), Johnson et al. (1982), e Jacob et al. (1987).

Materiais e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Seis exemplares (3 machos e 3 fêmeas) de *C. durissus* e *B. jararaca* foram examinados mensalmente, sendo recém - mortos ou fixados para mensurações externas, registrando-se o comprimento rostro-cloacal (CRC), o comprimento da cauda (CC) e as massas corpóreas, seguindo-se depois os estudos anatômicos. O sistema reprodutor foi dissecado, evidenciando-se os componentes estruturais, além da condução de observações descritivas e comparativas dos órgãos.

Nas fêmeas, foram registrados o número e o comprimento dos folículos ovarianos ou ovos presentes no oviduto. Nos ovários foram observados dois tipos de folículos estando: em vitelogênese primária ou secundária, respectivamente (ALDRIDGE, 1979b). A vitelogênese primária foi chamada de fase quiescente e a vitelogênese secundária foi denominada de fase ativa do desenvolvimento folicular. No útero tanto os embriões quanto os fetos e seus anexos embrionários, foram dissecados para observação anatômica macroscópica. Além disso, cordões umbilicais de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento foram seccionados para análises histológicas, antes e durante a retração do vitelo. Após a desidratação e inclusão em historresina, cortes seriados (2 μ m) foram corados com azul de toluidina-fucsina (TF). Os fetos também tiveram a massa do corpo e a do vitelo tomado para comparações.

Paralelamente às etapas anteriores, fêmeas prenhes de *Crotalus durissus* (cascavel, n = 10) e *Bothrops jararaca* (jararaca, n = 9) foram mantidas em biotério para observação da época de nascimento, número, massa corpórea e comprimento dos filhotes, objetivando-se verificar correlações com a massa corpórea e o comprimento das mães, o que permitiu realizar cálculos sobre os índices de fecundidade, segundo SHINE (1980).

Após os nascimentos, foram anotados o comprimento rostro-cloacal (CRC) e a massa corpórea das fêmeas e filhotes, número de filhotes e massa total das ninhadas. Também foram medidas fêmeas adultas de cada espécie para estimativa do tamanho corporal. O comprimento rostro-cloacal (CRC) de adultos e filhotes foi comparado entre espécies pelo teste t (Student). A massa corpórea de adultos e filhotes, bem como as massas totais das ninhadas foram comparadas entre as espécies por análise de covariância (ANCOVA), tendo por covariável o comprimento rostro-cloacal. A MRN (massa da ninhada/massa da mãe pós-parto) também foi estimada segundo (SHINE, 1980; SEIGEL; FORD, 1987). Os pesos de dois tipos de gorduras encontradas em recém-nascidos de jararacas e cascavéis, foram analisados, para isso, filhotes preservados de sete ninhadas de jararaca e quatro de cascavel tiveram os seguintes dados tomados: sexo, comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento da cauda (CC) e massa (g). Posteriormente os filhotes foram dissecados para a remoção e pesagem de dois tipos de gorduras. O comprimento rostro-cloacal e o peso das duas gorduras foram comparados entre ninhadas por análise de variância (ANOVA) e entre os sexos e espécies pelo teste t (Student). A massa corpórea dos filhotes foi comparada por análise de covariância (ANCOVA), tendo como covariável o comprimento total do corpo dos filhotes ($CT = CRC + CC$).

Nos machos, recém sacrificados, os testículos e os ductos deferentes foram removidos da cavidade abdominal. Os ductos deferentes foram divididos em três partes: proximal, intermediária e distal relativamente aos testículos. Além disso, foram utilizados exemplares machos ($n = 212$) de espécimes preservados da coleção Herpetológica do Instituto Butantan (IB). Nestes exemplares preservados, foram medidos o comprimento rostro-cloaca (CRC), o comprimento do testículo e o diâmetro distal do ducto deferente em todos os meses do ano. Os comprimentos relativos dos testículos e ductos deferentes foram analisados por testes Kruskal-Wallis e teste Post-hoc de comparações múltiplas. O índice de dimorfismo sexual

(SSD) foi calculado utilizando a fórmula “ $1 - (\text{CRC médio dos adultos do sexo de maior tamanho} / \text{CRC médio dos adultos do sexo de menor tamanho})$ ” (SHINE, 1994).

Procedeu-se o inventário dos registros de acidentes atendidos no Hospital Vital Brazil (HVB), do Instituto Butantan (IB), no período de 1991 a 2003 para *B. jararaca*, e de 1981 a 2003 para *C. durissus*. Realizou-se, ainda análise biométrica dos animais-testemunho depositados na coleção do Hospital Vital Brazil (HVB), do Laboratório de Herpetologia, para determinação do estágio de maturação sexual, diferenciando portanto adultos e filhotes. Foram caracterizadas as épocas dos acidentes ofídicos, como indicativo do padrão de atividades em *B. jararaca* e *C. durissus*, de acordo com os estudos de Sazima (1988). O teste de Qui-quadrado foi utilizado para avaliar a frequência dos acidentes ofídicos em machos e fêmeas. As serpentes utilizadas eram procedentes da cidade de São Paulo, principalmente da região metropolitana, recebidas do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan (IB).

As análises estatísticas foram baseadas em metodologia preconizada por ZAR (1984), utilizando-se os programas estatísticos GraphPad Prism, Statistic e Excel (Windows 98, EUA). O nível de rejeição para todos os testes estatísticos foi de 0,05.

3.2 OBTENÇÃO DE BLOCOS PARA MICROSCOPIA

As distinções entre folículos quiescentes e vitelogênicos foram feitas por meio do comprimento. Após exames macroscópicos, amostras de folículos ovarianos; vaginas e úteros foram coletados e fixados para estudos de microscopia de luz, compreendendo análises histológicas e histoquímicas.

3.2.1 Processamento em paraplast ou parafina

Para estudos histológicos os materiais foram recortados em pequenas peças de 0,5 cm de aresta e colocados em solução fixadora de paraformaldeído a 4%, tamponado em PBS em pH 7,2. O material foi desidratado em uma série crescente de etanol, de 70 a 100% e diafanizados em xilol, seguida da inclusão em paraplast ou parafina. Cortes finos foram realizados com aproximadamente 3 a 5 micrômetros, e em seguida corados. Durante a gestação, mensalmente em ambas as espécies de serpentes, foram analisados embriões e estruturas extra-embrionárias em várias fases do desenvolvimento. Placentas com os conceptos foram coletados em fêmeas de termo. Após a coleta, as placentas e os embriões foram fixados em formol e paraformaldeído a 10%. Amostras de placentas foram retiradas da região mesometrial do útero.. Após a desidratação, os materiais foram incluídos em historresina obtendo-se cortes seriados de 3 μ m, corados com azul de toluidina–fucsina e ácido periódico-Schiff (PAS). As outras placentas e os embriões foram dissecados para observações de anatomia macroscópica. Os estágios embrionários foram determinados pela escala de Zerh (1962), a qual foi desenvolvida para a serpente colubrídea *Thamnophis sirtalis*.

Os testículos foram cortados sagitalmente, e imersos junto com as estruturas anexas de cada animal, em fixadores histológicos. Os fixadores utilizados foram formol e Karnovsky, empregando-se principalmente solução tamponada de formalina a 5%, em tampão fosfato de sódio, pH 7,2 a 0,1 M. Os cortes histológicos dos testículos e ductos anexas, incluídos em historresina, foram corados com HE e azul de toluidina fucsina pH 1,5 a 4,0.

O material histológico foi analisado e documentado em fotomicroscópio Zeiss Axioskop (Carl Zeiss, Alemanha).

3.2.2 Processamento em historresina

As amostras fixadas em paraformaldeído tamponado em PBS, pH 7,2 e incluídos em historresina (LEICA). Os cortes foram corados com toluidina-fucsina, PAS e “Alcian Blue” pH 2,5.

3.2.3 Processamento para microscopia eletrônica de transmissão

As pequenas amostras dos materiais coletados foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, tampão “cacodylate de sódio” 0,1 M, pH 7,2, e pós-fixadas em tetróxido de ósmio. Foram a seguir imersas em acetato de uranila 2% e emblocadas em resina epoxy. Cortes ultrafinos foram examinados em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E, operando em 80 kV, no Laboratório de Biologia Celular do IB.

3.2.4 Processamento para microscopia eletrônica de varredura

Serpentes fêmeas adultas de ambas as espécies foram examinadas de março a outubro, objetivando detectar eventuais presenças de folículos vitelogênicos e a ocorrência de espermatozoides no trato reprodutivo. As membranas extra-embrionárias, e o epitélio uterino, foram coletados em pedaços de em média, 5 cm de largura e enroladas para permitir a sua integridade e separação. Estes fragmentos tissulares do útero e anexos embrionários foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato a 0,1 M pH 7,4 e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%. Seguiram-se desidratação a seco em ponto crítico (Balzers CPD 020), montagem em suportes metálicos e revestimento com ouro ("sputtering" Emitech K 550). A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em um ME Leo 435 VP.

3.3 COLETA DE SANGUE

Amostras individuais de sangue (8,0 ml) foram coletadas de cascavéis, mensalmente, a partir da veia hepática em um tubo de polietileno contendo 1 ml de heparina e foram centrifugados em 10.000 g, 4⁰C por 50 minutos. Os plasmas obtidos foram estocados a -20⁰C por 3 meses até as análises. Essas foram feitas no Laboratório de Farmacologia do IB.

3.3.1 Determinação de hormônios sexuais

O plasma foi descongelado em temperatura ambiente e o nível de estradiol e progesterona foi medido por radioimunoensaio, utilizando-se “kit” de estradiol e progesterona (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) de acordo com as instruções dos fabricantes. Os resultados foram expressos em picogramas (pg) de estradiol/ml de plasma ou em nanogramas (ng) de progesterona/ml de plasma. Os exemplares utilizados foram dissecados durante os dois anos do experimento, sendo os estágios reprodutivos identificados e acompanhados por meio da anatomia macroscópica. Os valores obtidos mensalmente de estradiol e progesterona, foram analisados por testes Kruskal-Wallis e teste Post-hoc de comparações múltiplas.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 ANATOMIA DO APARELHO REPRODUTOR DAS FÊMEAS

A anatomia do aparelho reprodutor de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus* é composta de dois ovários, dois ovidutos e uma vagina bilobada. Os ovários dispõem-se assimetricamente, sendo o ovário direito mais cranial e maior em relação ao ovário esquerdo (Figura 1). Esses órgãos estão fixos à parede dorsal do corpo pelo mesovário. Nos ovários foram encontrados folículos quiescentes (V1) transparentes ou esbranquiçados e sem deposição de vitelo e folículos amarelos ativos (V2) com deposição de vitelo (Figura 2).

4.1.1 Histofisiologia dos ovários

Os ciclos reprodutivos de serpentes podem ser caracterizados pela época de crescimento folicular. Os ovários apresentam $21 \pm 9,9$ folículos em cada ovário em *B. jararaca* e $15 \pm 6,7$ folículos em *C. durissus*, são pequenos (<10 mm de comprimento), brancos e semitransparentes durante a primavera e início de verão (vitelogênese primária). No final do verão de 8 a 10 folículos em cada ovário iniciam um crescimento rápido, e no final do outono estes folículos tornam-se amarelos (< 20 mm, vitelogênese secundária), (Figura 2). A vitelogênese secundária é a fase em que ocorre rápido aumento de massa de folículos ovarianos, sendo decorrente do acréscimo de íons, sais minerais e vitelo. Em *B. jararaca* e *C. durissus* esses folículos variam de 10 a 30 mm (Figura 1).

Figura 1 - Aparelho Reprodutor de *C. durissus*. e *B. jararaca*, sendo indicados: infundíbulo (i) folículo ovariano (fo) parte anterior do útero (u a) parte posterior do útero (u p) e vagina (v)

Figura 2 - Influência hormonal (estrógeno e progesterona) nos folículos ovarianos em diferentes estágios reprodutivos em cascavéis e jararacas. Vitelogênese primária e secundária (V1 e V2) e pós parto (PP)

Figura 3 a - Variação sazonal do diâmetro do maior folículo de *Bothrops jararaca* fase quiescente: Vitel. 1 (●); fase ativa: Vitel. 2 (●) e ovos ou embriões no Interior do oviduto (●). Seta indica época da cópula

Figura 3 b - Variação sazonal do diâmetro do maior folículo de *Crotalus durissus* fase quiescente: Vitel. 1 (●); fase ativa: Vitel. 2 (●) e ovos ou embriões no interior do oviduto (●). Seta indica época da cópula

4.1.1.1 Microscopia de luz

Microscopicamente os folículos que compõem os ovários, são compostos de ovócito, camada granulosa e teca folicular (Figura 4 a,b). A teca apresenta-se constituída por células alongadas e fibras colágenas, arranjadas de forma circular em torno da granulosa, sendo que a porção mais próxima possui uma concentração maior de fibras para colágeno positivas. (Figura 4 c,d). Células grandes, denominadas de células piriformes, foram encontradas no meio da camada granulosa, situando-se entre uma camada de células pequenas e outra camada de células intermediárias. Entre a teca e a granulosa, observa-se uma região PAS+ constituindo a membrana basal da granulosa. O ovócito é repleto com material homogêneo e fracamente eosinófilo, com vacúolos, e é circundado pela zona pelúcida. As fêmeas em V1 apresentam uma granulosa composta por 3 tipos de células: células pequenas, intermediárias e piriformes. Em fêmeas V2, na granulosa, as células piriformes estão bastante aumentadas em relação à fase anterior e com muitas granulações PAS positivas (Figura 4 d,f). Estas células são alternadas com células grandes vacuolizadas (Figura 4 c,d). A zona pelúcida é visível e o ovócito está repleto de grânulos de secreção PAS-positivos (Figura 4 c,f). Nos ovários de fêmeas em período pós-parto (PP), observa-se um vestígio do corpo lúteo com coloração castanho-amarelada e os folículos nessa fase assemelham-se aos observados durante a vitelogênese primária.

A variação sazonal do diâmetro do maior folículo de *B. jararaca* e *C. durissus* são observados durante os meses do ano (Figura 3). Fêmeas com folículos quiescentes (V1), no ovário, são observadas em todos os meses do ano, e fêmeas com folículos em fase ativa do desenvolvimento (V2), iniciam o crescimento no final do verão e início de outono (Figura 3). Os folículos em fase ativa (V2) são facilmente reconhecidos macroscopicamente pela

Figura 4 - Microfotografias do ovário de *C. durissus* e *B. jararaca*. **a e b)** vitelogênese primária (V1), apresentando ovócito (OV), granulosa (G) e a teca do folículo (T); Barra = 100 μ m e 20 μ m, respectivamente. **c e d)** O ovário em vitelogênese secundária (V2), apresenta a granulosa com células piriformes (➡) com muitas grânulos PAS positivos (★). Em (e e f) a granulosa contém muitas células piriformes (➡) zona pelúcida (↔) e grânulos de secreção (★) PAS positivos. Paraplast, HE (a,b), Tricômio de Masson (c,d) e PAS (e, f), Barra = 20 μ m

mudança de cor e de tamanho. No início da primavera e final da primavera em cascavéis e em jararacas, respectivamente, aparecem nos ovidutos os primeiros ovos (Figura 3). O desenvolvimento embrionário progride durante o verão. Os períodos da gestação de cascavéis e jararacas duram em média de 4 a 5 meses, e a maioria das fêmeas inicia parturição do meio para o final do verão (Figura 3).

4.1.2 Histofisiologia dos ovidutos

Os ovidutos são órgãos pares e permanecem paralelos aos ovários, ocupando posições assimétricas na cavidade do corpo, sendo o oviduto direito mais cranial em relação ao esquerdo. O aparelho reprodutor feminino nas duas espécies, apresenta assimetrias de comprimento entre os ovidutos, sendo que o oviduto direito possui um número maior de ovos ou embriões. Contudo *B. jararaca* apresenta maior assimetria de forma e posição ovidutal bem mais contrastada em relação a *C. durissus* (Figura 1).

Os ovidutos são divididos em infundíbulo; útero (anterior e posterior) e vagina (Figura 1). A divisão do oviduto das duas espécies é predominantemente ternária, observando-se um infundíbulo, útero (onde ocorre a gestação) e vagina.

O infundíbulo, a porção mais cranial do oviduto, é uma estrutura delgada em forma de funil e com muitas dobras murais, recebendo os folículos durante a ovulação. O útero anterior é responsável pelo desenvolvimento embrionário. No estágio de vitelogênese secundária, foi observado no útero um aumento de pregas, aonde vão ser formadas as câmaras individuais para receber os ovos. Entre a região uterina anterior e a vagina, existe uma região longa e sem pregas que se mostra contraída após a cópula e dilata-se durante a prenhez, sendo denominada de útero posterior (Figura 1). Essa contração do útero posterior permite a retenção dos

Figura - 5 Útero posterior contraído e convoluto em cascavel (a) e jararaca (b). Os espermatozoides permanecem armazenados e estocados nestas regiões (◀▶). Na cascavel observam-se as vaginas bilobadas (V); abaixo do útero contraído, observam-se o intestino (I); e ao lado o rim (R). Em jararaca, observa-se um folículo ovariano (F) e abaixo do útero contraído, observa-se o intestino (I); a,b - Barra = 3,9 e 1,7 cm, respectivamente

espermatozóides, os quais permanecem aí estocados durante o inverno (Figura 5). O útero posterior e a vagina formam a porção mais caudal do oviduto.

4.1.2.1 Microscopia de luz

Infundíbulo – O epitélio infundibular apresenta células mucosas e células ciliadas. Muitas células apresentam grânulos que reagem fortemente ao (PAS).

Útero anterior – A região anterior do útero, apresenta um epitélio baixo, com poucas células mucosas e poucas pregas (Figura 6 a). Nesta região, foram também observadas muitas glândulas tubulares se abrindo no lúmen uterino.

Útero posterior - Em cortes transversais, a mucosa do útero posterior, de ambas as espécies, apresenta pregas profundas, revestidas por células epiteliais ciliadas e mucosas (Figura 6 e 7). Há uma evidente diferença no espaço do lúmen quando se comparam regiões convolutas e não convolutas entre si, durante o período da contração muscular uterina (Fig. 8a e 9 a,b). O lúmen é bastante reduzido durante a contração muscular uterina. (Figura 8 a,b). As pregas uterinas são numerosas e evidentes, tanto em jararaca quanto em cascavel (Figura 6 e 7). Os espermatozóides são observados sempre associados com as pregas do epitélio uterino, muitas vezes com suas cabeças orientadas em direção aos cílios (Figura 6a,b e 7a,b).

4.1.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

Infundíbulo - O epitélio infundibular foi observado ser constituído de células ciliadas e não ciliadas entremeadas com células secretoras (Figura 9 a,b). Foi observado que as bordas da região infundibular eram mais ciliadas (Figura 9 c,d).

Figura 6 - **a)** Fotomicrografia de corte transversal do útero anterior de *C. durissus*, apresentando uma menor quantidade de pregas e poucas células mucosas, o tecido conjuntivo adjacente com poucas células granulosas (cg). Fucsina-azul de toluidina, Barra = 40 μ m. **b)** Pregas do epitélio uterino posterior (★) de *C. durissus*, com grande quantidade de espermatozoides na luz, com as cabeças (em azul) voltadas em direção ao epitélio. Tecido conjuntivo com muitas células granulosas (cg), Fucsina-azul de toluidina, Barra = 40 μ m. **c)** Aumento maior da prega, mostrando espermatozoides na luz, com as cabeças (em azul) voltadas para o epitélio. Células ciliadas (setas) e mucosas (●) do tecido epitelial. Fucsina-azul de toluidina, Barra = 10 μ m

Figura 7 - Fotomicrografia de corte transversal do útero posterior de *B. jararaca*. **a)** Observam-se diversas dobras (setas) apoiadas no tecido conjuntivo e o lúmen é bastante reduzido, o epitélio apresenta células ciliadas (*) e células mucosas (★). **b e c)** Os vilos da parte posterior do útero mostram espermatozoides (▶) na luz, com as cabeças coradas (em azul) e voltadas para o epitélio uterino. Fucsina-azul de toluidina, Barra = 20 μ m

Figura 8 - **a)** Fotomicrografias de corte histológico transversal do útero posterior contraído e convoluto, evidenciando o lúmen bastante reduzido e diversas dobras (➡) estão inseridas no tecido conjuntivo (*). A musculatura longitudinal e circular (**mu**) recobre todo o útero. Toluidina e fusina, Barra =. **b)** Corte transversal do útero posterior em 3 dimensões, observar as dobras do epitélio e a musculatura (**mu**) M.E.V.

Útero posterior - Nessa fase o útero é caracterizado por uma contratura muscular uterina, tomando a forma de uma espiral dada pela contração das camadas musculares externas e, assim permanecendo, até a ovulação ocorrer em ambas as espécies (Figura 8b;10a e 12a,b). Nas fêmeas em vitelogênese ativa, no ovário os espermatozóides foram vistos no lúmen e dentro das dobras murais do útero posterior, indicando acasalamento recente. A microscopia de varredura do útero cortado longitudinalmente mostra dobras internas murais que acompanham a disposição anatômica espiralada (Figura 8 a,b). Essas dobras são recobertas por epitélio ciliado contendo células secretoras de muco (Figura 10 b,c; 12 b,c). Massas espermáticas são observadas sobre o epitélio (Figura 11b e 12e) e os espermatozóides aparecem em contato com os cílios, muitas vezes com suas cabeças imersas entre eles (Figura 11a e 12 c,d,e).

Os epitélios de ambas as serpentes, nesta região da estocagem, apresentam muitas células ciliadas, entremeadas com células mucosas e com grânulos de secreção na região apical (Figura 13d,e,f; 142b). Em *B. jararaca* em corte transversal, observa-se, glândulas mucosas, repletas de grânulos que se abrem no lúmen, com muitos espermatozóides localizados entre as dobras (Figura 13 a,b,c). Em aumento maior, observa-se uma grande quantidade de grânulos de secreção, brotando do lúmen (Figura 13 e,f).

4.1.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão

O útero posterior de *C. durissus* é bastante ciliado e apresenta uma grande quantidade de mitocôndrias na região apical das células epiteliais (Figura 14 a). Células mucosas apócrinas sem cílios, são observadas descarregarem a secreção no lúmen, entre os cílios do epitélio uterino. A secreção mucosa está contida em grânulos, com um conteúdo heterogêneo e de baixa elétrôn-densidade (Figura 14a e 15b). Nesta região, espermatozóides em diferentes secções longitudinais, foram observados perto da borda do epitélio uterino (Figura 15 a,b).

Figura 9 - Micrografia eletrônica de varredura do oviduto de *C. durissus*. a e b) Dobras internas da região infundibular mostrando o epitélio com células secretoras (S) e células ciliadas (C). Nas pregas do óstio infundibular observa-se o aumento do número das células ciliadas (C), c e d

Figura 10 - M.E.V Contração da musculatura uterina em *Crotalus durissus*, com dobras internas que acompanham a forma espiralada. **a)** A seta indica corte transversal. **b)** Aumento da área, mostra o epitélio ciliado (Ci) com espermatozoides (E) no lúmen entre as dobras. **c)** Cabeças dos espermatozoides entre o epitélio ciliado (setas) e áreas provavelmente correspondendo a células mucosas (*) estão marcadas com asteriscos

Figura 11 - M.E.V. **a)** A micrografia mostra espermatozoides associados com as dobras do epitélio ciliado. Algumas cabeças (*) emergem dos cílios enquanto as caudas estão imersas. Áreas abertas, correspondendo, provavelmente a células mucosas estão marcadas por (*). **b)** Detalhes das dobras da musculatura uterina, mostrando uma massa de espermatozoides no epitélio ciliado

Figura 12 - M.E.V. **a e b)** Contração da musculatura uterina em *B. jararaca*, com dobras internas que acompanham a forma espiralada. **c)** Espermatozoides no lúmen das dobras. **d)** Cabeças dos espermatozoides (*) entre o epitélio ciliado. **e)** Detalhes de espermatozoides no lúmen do epitélio uterino, espermatozoide com a cabeça enfiada no epitélio (seta)

Figura 13 - a) Contração muscular uterina em *B. jararaca*. b e c) Aumento maior da área marcada em a na região da estocagem, com espermatozoides (*), epitélio ciliado (C) e células mucosas com muitos grânulos de secreção (➤ ➤ e f) Epitélio uterino de *C. durissus*, com grânulos de secreção (➤ ➤

4.1.3 Histofisiologia das vaginas

4.1.3.1 Microscopia de luz

A vagina de ambas as espécies possui musculatura forte, constituída pela lâmina própria e camadas bem desenvolvidas de musculatura circular e longitudinal. É revestida por epitélio colunar pseudo-estratificado, constituído por células ciliadas e células mucosas (Figura 16 c,d). A porção da vagina corada com PAS, mostra o muco secretado pelas células glandulares do epitélio (Figura, 16 a,b). As células mucosas do epitélio vaginal também se coraram fortemente com o Alcian Blue. O tecido conjuntivo adjacente possui numerosas células, apresentando grânulos esféricos (Figura 16 c). Na microscopia eletrônica de transmissão elas foram observadas em vasta quantidade no tecido conjuntivo e seriam provavelmente mastócitos.

4.1.3.2 Microscopia eletrônica de varredura

No epitélio vaginal em MEV, foram observadas células ciliadas em grande quantidade e células mucosas com microvilos se abrindo para o lúmen com muitos grânulos de secreção. O epitélio vaginal é formado por células mucosas com microvilos em grande número, e por células ciliadas (Figura 17 a,b). Em um corte longitudinal das regiões vaginal e uterina, observam-se que as porções posteriores da vagina estreitam-se abruptamente, abrindo-se para o útero posterior (Figura 18a). O útero posterior, apresenta-se convoluto, durante a época da estocagem de esperma (Figura 18 a). O aumento maior desta área, indica que o epitélio

Figura 14 - Eletromicrografia de transmissão do útero posterior, de *C. durissus*. **A**) Células ciliadas (c) apresentam uma grande quantidade de mitocôndrias na região apical (m). A secreção mucosa está contida em grânulos (g). A seta indica células mucosas apócrinas sem cílios, descarregando secreção, núcleos estão na região basal (N). Espermatozóides (Es) estão no lúmen perto dos cílios, (Barra = 0,9 μm). **B**) Micrografia eletrônica de varredura, mostrando o epitélio uterino com células ciliadas (c) e células mucosas com grânulos (g) de secreção no ápice. Espermatozóides (Es) são observadas entre elas

Figura 15 - Eletromicrografia de transmissão de várias seções de espermatozoides associado ao epitélio uterino (E) de *C. durissus*. **(A)** Espermatozóide em seção longitudinal com a cabeça apresentando o núcleo fortemente eletrodenso (★), peça intermediária (◈) e cauda (seta), (Barra = 1,0 μm). **(B)** Seção transversal da cabeça do espermatozóide (setas). Microvilos (m) e grânulos de secreção (g) das células mucosas, (Barra = 1,0 μm)

uterino é bastante ciliado e cabeças de espermatozóides são observadas entre os cílios (Figura 18 b).

A porção vaginal é ampla e bastante pregueada (Figura 18 a). O aumento maior desta área, apresenta epitélio constituído por células mucosas com microvilos e tufo grandes de células ciliadas (Figura 18 c).

Morfológicamente o útero posterior, de ambas as espécies, apresenta-se menos musculoso (Figura 18 a). E, dependendo do estado de contração do útero posterior ocorre uma evidente variação do volume do lúmen que pode chegar a desaparecer (Figura 8 a,b). Entretanto, em muitos casos, observou-se a presença de uma matriz carregadora no lúmen do útero posterior (Figura 19 a,b). Esta matriz carregadora é composta de material celular e secreção mucosa (Figura 19 b,c). Contrariamente, o lúmen vaginal é bastante amplo e não foram observadas contrações que diminuíssem o espaço luminal. Na histologia, observa-se que a vagina é revestida por um epitélio mais alto do que o do útero. No tecido conjuntivo aparecem muitas células do tipo de mastócitos.

Estes resultados mostram que há uma evidente diferenciação anatômica e histológica entre a vagina e o útero. Diferentes do útero, as vaginas são amplas e bilobadas ou bifurcadas, em ambas as espécies. Entretanto esta bifurcação em cascavéis apresenta um padrão mais contrastado do que as jararacas, praticamente dividindo a vagina de cascavéis em duas partes distintas (Figura 16).

Ambas as vaginas possuem forma e tamanho semelhantes e compatíveis a cada hemipênis (Figura 20 a, b). O comprimento das vaginas em jararacas foi de $21,71 \pm 1,02$ mm ($n = 8$), e o de cascavel foi de $47,72 \pm 1,63$ mm ($n = 5$). As cascavéis possuem vaginas maiores do que as jararacas e a diferença de tamanho entre as duas espécies, foi significativa ($t = 13,51$, $df = 14$, $p < 0,001$).

Figura 16 - Fotografias das vaginas de cascavéis e jararacas, Barras = 0,14 e 0,11 cm respectivamente. Fotomicrografias dos epitélios vaginais de *C. durissus* e *B. jararaca*, respectivamente. a e b) Porção da vagina com PAS +, mostrando o muco secretado pelas células glandulares do epitélio (setas). Tecido conjuntivo (tc) e lúmen (L), PAS, Barra = 30 μ m e 20 μ m. c) Corte transversal da vagina, mostrando um epitélio colunar pseudo-estratificado, com células ciliadas (setas) e células mucosas. A vagina é caracterizada pela grande quantidade de células granulosas (cg) no tecido conjuntivo, em *C. durissus*, PAS, Barra = 40 μ m. d) Aumento maior das células do epitélio vaginal, indicando as granulações (seta), em *B. jararaca*, Fucsina-azul de toluidina, Barra = 20 μ m

Figura 17 - a) Micrografia eletrônica de varredura, do epitélio vaginal de *C. durissus* mostrando os cílios (C) e grânulos de secreções (➡), (S). b) Aumento maior do epitélio, com o cílios (C) no centro, e grânulos de secreção (➡)

Epitélio uterino

Epitélio vaginal

Figura 18 - a) Micrografia eletrônica de varredura, mostrando corte transversal do útero (U) e vagina (V). b) Aumento maior da área marcada, mostrando útero (U) convoluto exibindo epitélio bastante ciliado (★), com células mucosas (➡) e cabeças de espermatozoides enterradas entre os cílios (▶). Região da vagina (V) exibindo muitas pregas. c) Aumento maior da área, com o epitélio vaginal exibindo tufo de células ciliadas (★) e muitas células mucosas, com microvilos (➡).

Figura 19 - a) Corte transversal do útero não contraído de *C. durissus* apresentando uma quantidade de “matriz carregadora” (*), e poucas dobras, e musculatura (Mu). b e c) Aumento maior da secreção denominada de “matriz carregadora”, composta de material celular (setas) e secreção mucosa. Borda do epitélio mucoso (E). Toluidina- azul de fucsina, Barra = 200 μ m

4.1.4 Histofisiologia da placenta

Após a ovulação e fertilização ocorrerem na primavera, em ambas as serpentes, inicia-se o desenvolvimento embrionário no oviduto. Durante a prenhez os ovidutos, repletos de embriões, ocupam todo o terço ventro-caudal da cavidade pleuroperitoneal (Figura 21 a,c). Os embriões ocupam nas fêmeas prenhes um espaço disposto ao longo de todo o oviduto, sendo caracterizado como uma série de câmaras separadas por constrições, denominado útero (Figura 21 a,c). As paredes do útero formam pregas, ao redor das quais internamente as membranas extra-embrionárias se desenvolverão. No início da gestação, observa-se uma grande quantidade de vitelo, proveniente do folículo ovariano (Figura 21 b,d). As câmaras separadas pelas constrições, isolam os embriões uns dos outros (Figura 21 d). No início do desenvolvimento embrionário, observa-se o disco germinativo, e entre cada ovo a presença destas constrições (Figura 22 a,b). A artéria e a veia uterina correm longitudinalmente ao longo da superfície dorsal do útero, adjacente ao mesométrio. Estes grandes vasos conectam-se a arcos sucessivos que passam circunferencialmente em volta do útero (Figura 22 c,g). O útero é vascularizado predominantemente por uma artéria e uma veia passando ao longo da superfície dorsal de cada câmara incubadora (Figura 22 g). A porção da artéria secundária ovidutal Blackburn (1998) que permanece ao longo do útero é a artéria uterina, ela é suprida pela artéria primária com sangue da aorta dorsal. A veia secundária ovidutal corre longitudinalmente no útero, adjacente à artéria. Os ramos de vasos que passam transversalmente em volta de cada câmara incubadora rumam para a base do saco vitelínico em sua porção anti-mesometrial.

Durante a gestação de ambas as fêmeas, observa-se que a parede uterina distende-se ao redor do embrião e abaixo dela se observa uma fina membrana corioalantóica, a membrana da casca e o âmnio (Figura 22 e). Retirando-se o revestimento uterino e as membranas

Figura 20 - Vagina e hemipênis. (a) *B. jararaca*, Barra = 0,3 e 0,4 cm, respectivamente. (b) *C. durissus*, Barra = 0,8 e 0,9 cm, respectivamente; cabeça da seta indica o limite da vagina com o útero; cloaca (C); setas no hemipênis indicam o sulco espermático; Espinhos (◄); glândulas anais (✕)

Figura 21 - **a)** Gestação em *C. durissus*, corpo lúteo no ovário (setas), **b)** Embrião em desenvolvimento de cascavel, vitelo (V). **c)** Gestação em *B. jararaca*, Barra = 6 cm. **d)** Embrião em desenvolvimento em jararaca, vitelo (V), constrição (seta), Barra = 1 cm.)

Figura 22 - a e b) Disco germinativo, em *C. durissus*, Barra = 0,8 cm. c) Embrião de cascavel (estágio 26), Artéria uterina (seta), (Barra = 0,7 cm. d) Embrião de jararaca (estágio 32), Barra = 1 cm. e) Embrião de cascavel, (estágio 28) envolvido pelo útero, (→), corioalantóide (→), vestígio da membrana da casca (→), Barra = 1 cm. f) Feto de cascavel ligado ao cordão umbilical (→), Barra = 0,7 cm. g) Feto de cascavel totalmente desenvolvido, dentro da câmara incubatória (Ci), Artéria e veia uterina (seta) (útero e membranas fetais), Barra = 1 cm. h) Placenta Corioalantóide (seta), ligada ao feto e cordão umbilical (*), Barra = 2 cm

extraembrionárias o embrião encontra-se ainda ligado por meio do cordão umbilical, pelos vasos vitelínicos ao vitelo (Figura 22 f).

No início da gestação, de acordo com o estágio 16 de Zehr (1962) o embrião encontra-se envolvido no saco amniótico (Figura 23 a,b). O tronco está dobrado 180^0 ; o alantóide começa a inflar, e a membrana da casca, está ligada ao pedículo do embrião (Figura 23 b,c). Neste estágio as dobras neuronais ainda estão abertas (Figura 23 e). No estágio 20, foi observado um aumento do saco alantoideano, e quando o mesmo foi desconectado do embrião, observou-se intensa vascularização (Figura 23 f,g e h). De acordo com os estágios de desenvolvimento embrionário proposto por Zehr (1962) o desenvolvimento é finalizado no estágio 37. Após o estágio 20 do desenvolvimento embrionário, o alantóide progressivamente irá envolver o saco amniótico e o tecido da região dorsal do ovo, fusionando-se com o córion para formar um extensivo corioalantóide, constituindo a placenta corioalantóica.

4.14.1 Microscopia de luz

A estrutura placentária em *B. jararaca* e *C. durissus* é composta da aposição da mucosa uterina; do vestígio da membrana delgada da casca do ovo e da membrana corioalantóica.

A análise da placenta corioalantóica em microscopia de luz de *C. durissus* e *B. jararaca*, nos estágios finais da gestação de (30 a 37), mostram que o epitélio corioalantóide permanece adjacente ao epitélio uterino. O espaço, observado entre os tecidos extraembrionários e o útero pode ser artificial (Figuras 24; 25). Entre o epitélio corioalantóide e o uterino observa-se o vestígio da membrana da casca, bastante corada, muitas vezes formando um precipitado, tanto em jararaca quanto em cascavel (Figura 24c; 25c). Os epitélios coriônico e uterino são adelgaçados, formados predominantemente por capilares,

Figura 23 - **a-b)** Embriões de *C. durissus* envolvidos no saco amniótico (→) (Estágio 16 de Zehr). **c)** membrana fina, vestígio da casca (Mc), ligada ao pedículo na cauda do embrião. **d)** tronco dobrado 180 e alantóide começando a inflar. **e)** porção anterior das dobras neuronais ainda aberta (setas). Embriões no (Estágio 20 de Zehr) **f, g e h,** a membrana corioalantóica (setas) foi desconectada do embrião e exibe intensa vascularização, coração do embrião (★)

onde foram observados muitos eritrócitos em seu interior (Figura 24 e,f). O epitélio uterino, de *C. durissus* é formado de um epitélio cúbico simples (Figura 24 a,c), e o de *B. jararaca* de um epitélio escamoso (Figura 25 a,d). Muitas pregas foram observadas entre as interfaces fetal e maternal (Figura 27 b,c ; 25 a,b). As pregas uterinas tanto em cascavéis, como em jararacas apresenta um epitélio fino monolaminar consistindo de muitos capilares e células epiteliais cuboidais e escamosas, respectivamente. As pregas uterinas e coriônicas se interconectam ou se interdigitam (Figura 24c,b ;25 a,b). As pregas coriônicas invadem o epitélio uterino (Figura 24 d; 28 d). Numa seção frontal, estas pregas uterinas alongadas são envolvidas por pregas do tecido coriônico (Figura 24 b ; 25 b). A interface materno-fetal apresenta ainda muitas especializações, em ambas as espécies tais como: cílios no epitélio uterino (Figura 26 c;d), granulações no epitélio coriônico no lado fetal (Figura 26 a;b) e muitas glândulas no lado materno (Figura 24 d; 25 a,d). Estas granulações, observadas no epitélio coriônico em cascavéis eram PAS positivos (Figura 26 b). O embrião encontra-se voltado para o lado mais vascularizado, ou seja, para o pólo mesometrial do útero, correspondendo à área de entrada dos principais vasos maternos (Figura 21 g).

4.1.4.2 Microscopia eletrônica de varredura

A morfo topografia das membranas placentárias, examinadas em M.E.V, mostra que o epitélio coriônico da placenta corioalantóica de *B. jararaca* e *C. durissus*, no “site” da placentação, consiste de células epiteliais achatadas, de formato irregular do tipo pavimentoso simples ou escamoso (Figura 27 a; c), caracterizando um aumento da área de absorção, na interface materno-fetal. Em aumentos maiores estas células apresentam microvilos (Figura 27 b).

Figura 24 - Fotomicrografia da interface da alantoplacenta Tipo II de *C. durissus* **a**) Epitélio coriônico sob os vasos alantóicos (); vestígio da membrana da casca (Mc); epitélio uterino (Eu), reveste os vasos uterinos (Vu). **b**) Visão geral da interdigitação entre o epitélio coriônico (Ec) e uterino (Eu). **c**) Pregas no epitélio uterino (Eu) e o epitélio coriônico (Ec). **d**) Invasão do epitélio coriônico (Ec) no epitélio uterino (Eu), Fucsina-azul de toluidina, Barra = 50 μ m. **e**) Capilares com eritrócitos (★) no epitélio coriônico (Ec) e pregas no epitélio uterino (Eu), com glândulas (G). **f**) Vasos uterinos (Vu) e capilares coriônicos (★), Fucsina-azul de toluidina, Barra = 20 μ m

Figura 25 - Fotomicrografia da interface da alantoplacenta Tipo II de *B. jararaca* no final da gestação. **a** e **b**) Visão geral da interdigitação entre o epitélio coriônico (Ec) e uterino (Eu); epitélio uterino (Eu) é do tipo escamoso e reveste os vasos uterinos (Vu). Barra = 50 μm; 100 μm, respectivamente **c**) Epitélio coriônico sob os vasos alantóicos (G); vestígio da membrana da casca (Mc); epitélio uterino (Eu), reveste os vasos uterinos (Vu) **d**) Pregas no epitélio uterino (Eu) e o epitélio coriônico (Ec); Invasão do epitélio coriônico (Ec) no epitélio uterino (Eu). Glândulas uterinas (G), Fucsina-azul de toluidina, Barra = 50 μm

O epitélio uterino em aposição ao córion, no local da placentação, em ambas as espécies, consiste de células ciliadas e não ciliadas. O epitélio é do tipo pavimentoso simples, contínuo e não erodido (Figura 28 a,b).

As membranas extra-embrionárias, formadas pelo córioalantóide são vascularizadas pelos vasos alantóicos. Em corte frontal da interface materno fetal, é possível observar os eritrócitos dentro dos capilares (Figura 29 a). Do mesmo modo, em todo o epitélio que reveste os vasos alantoidianos foi observado células intumescidas em toda a superfície (Figura 29 b). Vasos alantoidianos, com muitos eritrócitos em seu interior, foram observados no “site” da placentação (Figura 29 c).

A relação entre o epitélio uterino e as membranas extraembrionárias, constituindo a placenta corioalantóica de cascavéis e jararacas foi possível de visualizar, por meio do corte frontal em M.E.V, desta região (Figura 30 e 31). Em cascavéis observa-se que tanto os epitélios uterinos como os epitélios coriônicos formam varias pregas ou elevações que se interdigitam e interconectam, da mesma forma em que é observado na microscopia de luz (Figura 30). Em jararacas, na M.E.V., observam-se as pregas ou elevações do epitélio uterino e coriônico, interdigitando-se no local da placentação. A microscopia de luz, também evidencia estas pregas em ambos os epitélios (Figura 31). Tanto em cascavéis, como em jararacas, as interfaces materno-fetais são muito vascularizadas pelos vasos alantóicos e uterinos (Figura 29, 30 e 31).

De acordo com os relatos acima descritos, os ovidutos em *B. jararaca* e *C. durissus* apresentam vários papéis funcionais, tais como: estocagem de esperma, fertilização, transporte de ovos, manutenção do embrião (gestação e placentação) e parturição. Morfologicamente, contudo, o oviduto vai se modificar, conforme fatores fisiológicos endócrinos e parácrinos a fim de preparar o epitélio para as diversas funções exercidas ao longo do oviduto.

Figura 26 - Especializações da interface materno fetal em *B. jararaca* e *C. durissus*. **a)** Granulações no epitélio coriônico (Ec) de jararaca (seta) Fucsina-azul de toluidina, Barra = 10 μ m. **b)** Granulações no epitélio coriônico (Ec) de cascavel, PAS positivo (seta), Barra = 20 μ m. **c e d)** Células ciliadas (seta) e não ciliadas são observadas no epitélio uterino materno (Eu), de jararacas e cascavéis, membrana da casca (Mc), Fucsina-azul de toluidina, Barra = 10 μ m

No esquema do aparelho reprodutor (Figura 32), a região infundibular distal apresenta-se mais pregueada e com muitos cílios, visando a captação dos ovos. Na região proximal, o epitélio mucoso é secretor para receber os ovos e espermatozóides, sendo, portanto, a região de fertilização. A região uterina anterior, apresenta epitélio pavimentoso simples com microvilos e poucos cílios objetivando absorção na região uterina da placenta. Na região uterina posterior, o epitélio é bastante ciliado e mucoso para estocar e manter espermatozóides. E a vagina, apresenta epitélio mucoso e ciliado visando lubrificação e transporte de esperma para o útero (Figura 32).

4.1.5 EMBRIÕES

4.1.5.1 Saco vitelínico

No início do desenvolvimento embrionário os ovos de jararacas e cascavéis possuem uma grande quantidade de vitelo (Figura 21 b,d). No final da gestação, no entanto, foi observado que uma parte substancial deste vitelo, permanece ainda, no saco vitelínico. Antes do nascimento, no entanto, este vitelo é retraído por meio do cordão umbilical para dentro da cavidade abdominal dos nascituros (Figura 33 a). O vitelo é retraído, por meio do orifício do cordão umbilical, juntamente com o saco vitelínico, para a cavidade abdominal do feto pouco antes do nascimento, correspondendo aos estágios 36 ou 37 do desenvolvimento (Fig. 33 b). Esta retração se verifica aparentemente pelo encurtamento do tronco vitelínico, constituído pela artéria e veia vitelínica. Nestes recém nascidos, o vitelo retraído, posiciona-se ventralmente ao intestino e rins e é altamente vascularizado, sendo nutrido provavelmente pela veia umbilical (Figura 34 a;b). Do tronco vitelínico, fixado na transição piloro-duodenal, partem: (1) a veia vitelínica que se ramifica para o sistema porta hepático e para o duodeno, e

Figura 27 - **a)** M.E.V Células coriônicas da superfície corioalantóica de *B. jararaca*, estágio final da gestação. A superfície exposta permanece em aposição ao epitélio uterino em vivo, separada somente pela membrana fina da casca (removida). As formas achatadas e intactas das células permanecem subjacentes aos tecidos. **b)** Aumento maior, as células coriônicas apresentam a superfície epitelial coberta com microvilos. **c)** Aspecto geral da superfície lateral das células coriônicas, no site da gestação

Figura 28 - Epitélio uterino no “site” de placentação corioalantóica de cascavel e jararaca. Em *C. durissus* o epitélio uterino, consiste de células cúbicas ciliadas e não ciliadas, com microvilos. Aspecto geral do epitélio uterino em *B. jararaca* (b), apresentando células achatadas, ciliadas e não ciliadas. Em ambas o epitélio uterino apresenta-se contínuo e não erodido

Figura 29 - a) Epitélio corioalantóico (Ep), delgado de *B. jararaca*, com eritrócitos entre suas membranas (*); b) Superfície da membrana corioalantóica, vascularizada, por um vaso alantóico (Va), com células epiteliais intumescidas (*). c) Vasos alantóicos de *C. durissus* com eritrócitos em seu interior(*). Vestígios da membrana da casca (Mc) acompanham a membrana coriônica

Figura 30 - **a)** Micrografia eletrônica de varredura mostrando o epitélio uterino (Eu) de *C. durissus* com vilosidades (seta). O epitélio corioalantóide (Ec) interdigita - se com o epitélio uterino. **b)** Fotomicrografia da interface materno fetal destacando-se o epitélio uterino (Eu), com pregas e muitos capilares e cório (Ec) introduzindo-se entre as pregas uterinas; vestígio da membrana da casca (Mc).

Figura 31 - **a**) Fotomicrografia da interface materno fetal de *B. jararaca* destacando-se o epitélio uterino pregueado (Eu), com muitos capilares, o epitélio coriônico (Ec) introduzindo-se entre as pregas uterinas. Vestígio da membrana da casca (Mc). **b**) Micrografia eletrônica de varredura mostrando o epitélio uterino (Eu) com vilosidades; o epitélio corioalantóide (Ec) interdigitando - se com o epitélio uterino, Barra = 50 µm.

Figura 32 - Esquema do aparelho reprodutor, com as áreas correspondentes em M.E.V. Barra = 1,6 cm.

a artéria vitelínica que se insere na aorta dorsal (Figura 34 b;c) Numa fase posterior, à medida que o vitelo é consumido, observa-se apenas o tronco vitelínico.

4.1.5.2 Cordão umbilical

A conexão entre o feto e a placenta é realizada pelo cordão umbilical, por onde passam as artérias e as veias umbilicais e vitelínicas, levando e trazendo o sangue do feto para a placenta, respectivamente. O cordão umbilical, deste modo representa o conjunto de vasos e ductos encarregados do transporte de substâncias maternas necessárias ao desenvolvimento do feto, bem como as excretas fetais a serem transportadas à mãe.

O número de vasos envolvidos com o transporte de substâncias materno-fetais, no cordão umbilical de cascavéis e jararacas, está representado por duas artérias, uma veia e o ducto do alantóide, envoltos por uma substância de aspecto gelatinoso. Além destes vasos foram identificados dois outros vasos, representados por uma artéria e uma veia vitelínica, que se distribuíam ao longo de extensão da membrana coriovitelínica (Figura 35). Após a retração do vitelo para a cavidade abdominal do feto, no final do desenvolvimento, o cordão umbilical seccionado apresenta somente as artérias umbilicais e a veia umbilical e o alantóide (Figura 36).

4.1.5.3 Influências hormonais

Durante o ciclo reprodutivo de cascavéis e jararacas, observam-se diversas mudanças morfológicas que ocorrem nos ovários e ovidutos. O ovário apresenta várias fases do desenvolvimento folicular: vitelogênese primária (V1), vitelogênese secundária (V2), e nos ovidutos, observam-se folículos recém-ovulados (OV), a gestação inicial (GI) e final (GF). Em ambas as espécies estes estágios são sazonais, como foi mostrado acima.

Figura 33 - a) Cordão umbilical do feto de *C. durissus* mostrando o talo vitelínico (Tv) e o talo alantóico (Ta), Barra = 0,8 cm. b) Cordão umbilical do feto, no final do desenvolvimento mostrando o talo alantóico (Ta) e o momento em que o talo vitelínico (Tv) e o vitelo (V) estão entrando na cavidade abdominal do feto. Barra = 1,0 cm

Figura 34 - a) Recém nascido de jararaca, Barra = 1,2 cm. b) Filhote de cascavel mostrando a ligação do vitelo (v) com o duodeno (d), Barra = 1,0 cm d) tronco vitelínico (tv) de cascavel, fixado na região piloro-duodenal (pd) com as veias vitelínicas (vv) ramificando-se para o sistema porta hepático (ph) e para o duodeno (d), e artéria vitelínica (av), ligando-se na artéria aorta dorsal (aa). Barra = 1,2 cm

Figura 35 - a) Fotomicrografia do cordão umbilical de *C. durissus* evidenciando o alantóide (A), as artérias umbilicais (Au), veia umbilical (Vu) e o talo vitelínico, constituído de veia vitelínica (Vv) e artéria vitelínica (Av). Coloração TF. Bar = 100 μ m Fig. b) Fotomicrografia do cordão umbilical sem as estruturas do talo vitelínico, evidenciando o momento em que o vitelo(V) está entrando na cavidade abdominal do embrião. Coloração TF. Barra = 133 μ m

Figura 36 - Fotomicrografia do cordão umbilical de *C. durissus* sem as estruturas do talo vitelínico, apresentando as artérias umbilicais (Au), veia umbilical (Vu), e o alantóide (A), Coloração TF. Barra = 110 μ m

O ciclo reprodutivo das cascavéis está sob a influência dos hormônios estrógeno e progesterona (Figura 37). O teste de comparações múltiplas entre diversos estágios reprodutivos (Tabela 1), mostrou diferenças significativas entre eles ($H_{5, 102} = 44,141$ pg/ng/ml; $p < 0,001$).

As serpentes em vitelogênese primária, V1 em fase quiescente apresentam folículos pequenos e esbranquiçados, evidenciando a não deposição de vitelo (Figura 37). Os níveis de estrógenos e progesterona são baixos, quando comparados a outros estágios (Tabela 1). Em vitelogênese secundária, V2 durante a fase ativa, o folículo inicia a deposição de vitelo, tornando-se amarelado, os níveis de estrógenos são altos e maiores que os demais estágios reprodutivos (Figura 37; Tabela 1). Observa-se também um aumento de progesterona em relação à fase anterior. Na fase ovulatória (OV) do ciclo, observa-se uma queda de estrógenos, a qual é observada durante toda a gestação. Por outro lado, se observa um aumento de progesterona, a qual se mantém alta durante as fases da gestação, OV, GI e GF (Figura 37; Tabela 1). Nas serpentes pós-parto (PP), o nível de progesterona cai, drasticamente, mas o nível de estrógeno permanece o mesmo da fase anterior (Figura 37 ; Tabela 1).

4.1.5.4 Táticas reprodutivas

O esforço reprodutivo é um parâmetro que reflete a quantidade de reservas utilizada para a produção de filhotes em serpentes (Figura 38 a e b). A massa relativa da ninhada (MRN), bem como o número e tamanho dos filhotes produzidos, são medidas diretas do esforço reprodutivo em serpentes. Para estimativa do tamanho corporal (CRC) as fêmeas das duas espécies foram medidas e pesadas. Comparando-se fêmeas adultas de jararacas e cascavéis, foi constatado que fêmeas de cascavéis são mais pesadas, tendo valores médios de

Tabela 1 – Medianas dos valores hormonais em cascavéis. S. Paulo, 2004

	Mediana	Mínimo	Máximo	N	Estrógeno
V1	15,8 ^a	2,8	48,0	42	
V2	63,0 ^b	10,0	492,0	37	
OV	10,0 ^c	6,2	29,0	7	
GI	11,0 ^c	4,9	46,0	6	
GF	35,0 ^c	13,0	44,0	6	
PP	25,0 ^c	6,0	60,0	4	

	Mediana	Mínimo	Máximo	N	Progesterona
V1	0,8 ^a	0,24	52,5	41	
V2	1,7 ^a	0,16	52,5	37	
OV	19,2 ^b	2,4	31,8	7	
GI	31,6 ^b	13,6	54,3	6	
GF	20,9 ^b	4,6	35,2	6	
PP	7,3 ^c	0,33	16,9	4	

Figura 37 Influência hormonal durante o ciclo reprodutivo de *C. durissus*, nas diferentes fases do ciclo ovariano e oviductal, respectivamente: **V1** (fase quiescente) e **V2** (fase ativa); **OV** (fase ovulatória), **GI** e **GF** (gestação inicial e final), e **PP** (pós parto)

970,4 $\pm$ 49,7 g. do que as fêmeas de jararacas com 569,4 $\pm$ 42,36 g. Todavia, fêmeas de jararacas atingem tamanhos maiores com 111,4 $\pm$ 14,62 cm do que as fêmeas de cascavéis com em média 98,5 $\pm$ 8,50 cm. As diferenças entre as médias aritméticas dos valores obtidos foram consideradas significativas, para as duas espécies ou seja: ANCOVA, n = 43 de cascavéis; n = 37 de jararacas, $F_{1,77} = 107,5$ p <<0,01 (Figura 39; Tabela 2).

Figura 39 - Relação entre massa do corpo e comprimento rostro-cloacal (CRC) de fêmeas adultas de *Crotalus durissus* (círculos cinzas) e *Bothrops jararaca* (círculos). (pretos).

Figura 38 - a) Ninhadas de cascavéis. b) Ninhadas de jararacas. A) Filhotes de cascavéis são maiores do que os de jararaca (B), ($n = 161$, $t = 23,16$, $df = 160$, $p < 0,01$), Barra = 2,2 cm.

Tabela 2 – Sumário dos dados (média $\pm$ desvio padrão) de comprimento rostro-cloacal (CRC) e massa corporal de indivíduos adultos e filhotes de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca*. n = número da amostra. S. Paulo/IB, 2004

	n	CRC	Massa
Adultos			
<i>Crotalus durissus</i>	43	98,5 $\pm$ 1,5	970,4 $\pm$ 49,7
<i>Bothrops jararaca</i>	37	111,4 $\pm$ 2,4	569,4 $\pm$ 42,4
Filhotes			
<i>Crotalus durissus</i>	60	29,70 $\pm$ 4,19	31,03 $\pm$ 5,13
<i>Bothrops jararaca</i>	101	25,22 $\pm$ 5,12	12,07 $\pm$ 2,04

Fêmeas de jararacas adultas apresentaram CRC significativamente maior em comparação às de cascavéis. Porém, as cascavéis apresentaram maior massa corporal (Figura 39, Tabela 2). Os filhotes de cascavel, são bem maiores do que os filhotes de jararacas (Figura 38 c). Filhotes de cascavéis apresentaram maior CRC ($t = 23,16$, $df = 160$, $p < 0,01$) do que os filhotes de jararaca (Figura 40, Tabela 2) e a massa corporal foi maior em filhotes de cascavéis do que os filhotes da jararaca (ANCOVA $F_{1, 161} = 512,3$; $p < 0,01$) (Figura 40; Tabela 2).

Figura 40 – Relação entre massa do corpo e comprimento rostro-cloacal (CRC) de filhotes de *Crotalus durissus* (círculos pretos) e *Bothrops jararaca* (círculos cinzas).

As jararacas produzem mais filhotes por ninhada do que as cascavéis (Tabela 3). Apesar disso, a massa relativa média da ninhada (MRN) foi maior na cascavel do que na jararaca, porém esta diferença não foi significativa (Tabela 3).

Tabela 3 – Média $\pm$ desvio padrão do número de filhotes por ninhada e massa relativa da ninhada (MRN) de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca*, n = número da amostra. São Paulo/IB, 2004

Espécies	n	Número de filhotes	MRN
<i>Crotalus durissus</i>	10	11,7 $\pm$ 5,1	0,55 $\pm$ 0,2
<i>Bothrops jararaca</i>	9	17,75 $\pm$ 6,04	0,44 $\pm$ 0,1

Os filhotes das duas espécies diferiram no tamanho do corpo, sendo os filhotes de cascavel maiores e mais pesados do que os de jararaca (Figura 40, Tabela 2). Por outro lado, quando se observou a gordura encontrada na cavidade abdominal dos recém-nascidos (Figura 33 a), outros parâmetros foram averiguados. Na cavidade abdominal, foram identificados dois tipos de gordura, morfologicamente diferentes. Estas gorduras, foram identificadas como g1 e g2. Os resultados destas análises mostraram que além da gordura abdominal - g1, um tipo de reserva energética que acompanha o indivíduo durante toda a vida, elas mantêm parte do vitelo - g2 que não foi utilizado durante o processo de desenvolvimento embrionário (Figura 33 a,b). Este vitelo é retraído para a cavidade abdominal pouco antes do nascimento (Figura 33 b).

As massas das gorduras g1 em filhotes de jararacas foram significativamente maiores do que a dos filhotes de cascavéis sendo $n = 87$, $0,65 \pm 0,12$ g e $n = 53$, $0,53 \pm 0,15$ g, respectivamente ($t = 27,3$, $df = 138$, $p < 0,01$). E filhotes de jararaca, possuem valor médio de

g1 relativa à massa corpórea maior do que a de cascavel (Tabela 4). No entanto, a gordura remanescente do vitelo g2, em jararacas e cascavéis foi em média de $0,66 \pm 0,35$ g e $0,71 \pm 0,63$ g, respectivamente, e não apresentaram variações significativas ($t = 0,47$, $df = 35$, $p = 0,49$), apesar da média aritmética ter sido maior em jararaca (Tabela 4). Tal fato, sugere que as duas espécies investem igualmente na provisão dos filhotes.

Tabela 4 – Média $\pm$ desvio padrão dos valores da gordura abdominal (g1) e gordura do vitelo (g2) em relação à massa do corpo dos filhotes de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca*. n = tamanho da amostra. S. Paulo/IB, 2004

Espécies	n	g1	g2
<i>Crotalus durissus</i>	53	$1,75 \pm 0,61\%$	$2,36 \pm 2,31\%$
<i>Bothrops jararaca</i>	87	$5,39 \pm 1,00\%$	$5,32 \pm 2,68\%$

O comprimento do corpo da serpente (CRC) em relação ao tamanho da ninhada é outro fator que pode predizer dados sobre a fecundidade das serpentes. O número de filhotes e embriões, apresenta relação positiva com o tamanho (CRC) das fêmeas de jararacas ($n = 23$, $r^2 = 0,478$, $F = 19,18$, $p = 0,0001$) e cascavéis ($n = 33$, $r^2 = 0,38$, $F = 19,43$, $p = 0,0001$), (Figura, 41).

Figura 41 – Relação entre o número de ovos ou filhotes e comprimento rostro-cloacal (CRC) de fêmeas de *Crotalus durissus* (círculos cinzas) e *Bothrops jararaca* (círculos pretos). S. Paulo/IB, 2004

4.3 ANATOMIA DO APARELHO REPRODUTOR DOS MACHOS

Os machos de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus* apresentam dois testículos alongados, brancos amarelados, que se comunicam com a cloaca através dos ductos deferentes, tubos enovelados que terminam em papilas genitais (Figura 42). Os testículos são revestidos por uma cápsula fina translúcida, a túnica albugínea. A vascularização dos testículos é feita por ramos da artéria aorta dorsal e veia cava caudal (Figura 42c). Os machos de ambas as espécies também possuem assimetria de posição do aparelho reprodutor, sendo que o testículo direito é mais cranial do que o esquerdo (Figura 42c). O comprimento do testículo em jararaca variou de 0,8 a 5,8 cm e o de cascavéis de 1,9 cm a 6,0 cm (Tabela 5 e 7). A massa dos testículos em jararaca variou 0,09 a 0,45 g ($0,37 \pm 0,03$) e em cascavéis, de 0,03 a 0,17 g ($0,12 \pm 0,09$). Ambas as medidas, no entanto, sofrem mudanças cíclicas sazonais durante o período do ciclo reprodutivo.

Os órgãos copulatórios nas duas espécies consistem de dois hemipênis, os quais, quando em repouso, estão invaginados em dois sacos na base da cauda. Estes sacos se abrem na extremidade lateral, na borda da abertura anal. A forma dos dois tipos de hemipênis quando eretos, artificialmente, em ambas as espécies, podem ser observados nas (Figuras 20 e 42). São estruturas pares e tubulares e profundamente bifurcados, apresentam sulco espermático também bifurcado, posicionando-se no centro linearmente, objetivando a condução dos espermatozóides (Figura 20). O comprimento do hemipênis em jararacas foi $18,08 \pm 0,62$ mm, $n = 4$ e o de cascavel foi $59,58 \pm 1,50$ mm, $n = 5$ e a diferença de tamanho entre as duas espécies, foi significativa ($t = 23,14$, $df = 7$, $p < 0,0001$). Em ambas as espécies o hemipênis é revestido por espículas cutâneas (Figura 20 e 42).

Figura 42 - Testículos (TE) de *B. jararaca*: c) testículo direito (→) é mais cranial que testículo esquerdo. d) vascularização do testículo pela veia cava caudal e aorta dorsal. Barra = 9,7 cm

Figura 42 - a) Aparelho reprodutor de *C. durissus* e b) *B. jararaca*: testículos (TE) ducto deferente, proximal (DFP), médio (DFM) e distal (DFD) e hemipênis (H). Barra = 0,6 cm

As vias espermáticas de ambas as espécies, são formadas pelos ductos eferentes dos testículos, ductos do epidídimo e ductos deferentes. Os ductos deferentes são opacos e convolutos em machos adultos. Em ambas as espécies foram observadas diferenças morfológicas no diâmetro e convolução da região distal do ducto deferente (Figura 51 a,b). Esfregaços demonstraram que estes segmentos estavam repletos de líquido seminal com espermatozóides.

4.3.1 Histofisiologia dos Testículos

4.3.1.1 Microscopia de luz

As amostras tissulares dos testículos das serpentes foram coletadas e analisadas no período correspondente à maior atividade testicular, encontradas para ambas as espécies no verão. Os espécimes, aqui analisados, apresentaram espermatogênese completa (Figura 43). O epitélio é estratificado, sendo formado por espermatogônias, espermatócitos primários e secundários, espermátides e espermatozóides. (Figura 43 e,f). Este epitélio também é constituído de células de Sertoli, que estão situadas no compartimento basal dos túbulos seminíferos. Os testículos, são formados por túbulos seminíferos que estão separados entre si por uma pequena quantidade de tecido conjuntivo (tecido intersticial) com células de Leydig, observadas sozinhas ou em grupos (Figura 43 a,c; b,d).

Figura 43 - Fotomicrografia de seções transversais de túbulos seminíferos de *B. jararaca* (a, c e e) e *C. durissus* (b, d e f), destacando-se o epitélio seminífero (EP), a luz tubular (L), células de Leydig, presentes neste tecido (seta) e espermatozóides no lúmen (*). Fucsina-azul de toluidina, Barra = 50 μ m (a, b, c, d e e); Barra = 20 μ m (f).

4.3.1.2 Microscopia eletrônica de varredura

Os testículos estão envolvidos por uma fina camada de tecido conjuntivo, a túnica albugínea. Eles são divididos em lóbulos testiculares formados por septos internos do conjuntivo (Figura 44). Os túbulos seminíferos estão separados por tecido intersticial. Cada túbulo possui uma membrana própria de origem conjuntiva e o epitélio seminífero é constituído de células de Sertoli e células espermáticas.

A análise das fotomicrografias dos testículos de *B. jararaca* e *C. durisus* mostram a presença de numerosas células que formam o epitélio estratificado (Figura 45 a,b). No compartimento basal dos túbulos estão as células em desenvolvimento as espermatogônias e espermatócitos. Espermatídes e espermatozóides estão situados mais ao centro do lúmen tubular. As caudas dos espermatozóides se voltam para o interior da luz dos túbulos seminíferos (Figura 45 a,b). Os túbulos estão separados entre si por uma capa delgada de tecido conjuntivo (Figura 45 a,b).

4.3.2 Histofisiologia das vias espermáticas

4.3.2.1 Microscopia de luz

O epidídimo de ambas as espécies é composto de duas partes, a primeira consiste de pequenos túbulos chamados de dúctulos do epidídimo (Figura 46a). Em aumento maior, observa-se que as células do dúctulos epididimários consistem de células altas, algumas com evidências de secreção citoplasmática e com cílios longos, talvez predominando microvilos (Figura 46 b,c). Os dúctulos se inserem em uma estrutura maior, denominada ducto do epidídimo (Figura 46 a). A junção destes

Figura 44- Corte transversal do testículo de *B. jararaca*, revestido pela túnica albúnea () O testículo é composto de vários túbulos () que são revestidos por tecido conjuntivo e o lúmen destes túbulos estão repletos de espermatozoides (★).

Figura 45- Micrografia eletrônica de varredura dos túbulos seminíferos de *B. jararaca* e *C. durissus* e (a e b). Numerosas células formam o tecido estratificado do epitélio seminífero (EP). Os túbulos são envolvidos por tecido conjuntivo (➡). As caudas do espermatozóides em desenvolvimento se projetam para o interior da luz (L) dos túbulos seminíferos (➡).

Figura 46 - Fotomicrografia de cortes histológicos dos testículos e via espermáticas de *C. durissus*. **a)** Túbulos seminíferos (Ts) e confluência do ductulos epididimários (Dle I; Dle II) para (➡➡) o ducto epididimário (De); ao centro, epitélio da glândula adrenal (Ad) e Veia cava caudal (Vcc), Fucsina-azul de toluidina, Barra = 200 μ m. **(b e c)** Dúctulos epididimários (Dle I; Dle II), mostram a presença de cílios longos (*), secreções (•) e espermatozoides no centro (➡➡), Fucsina-azul de toluidina, Barra = 20 μ m e Barra = 10 μ m, respectivamente

dúctulos com o ducto do epidídimo é abrupta. O ducto epididimal tem um diâmetro maior e revestimento feito por epitélio não ciliado, com células colunares altas (Figura 46a). O ducto do epidídimo é contínuo com o ducto deferente e transita gradualmente para este, do mesmo lado, justamente posterior ao testículo (Figura 47 a,b).

Os ductos deferentes proximais já apresentam uma grande massa de espermatozóides no lúmen (Figura 47c). Em ambas as espécies, eles são revestidos por epitélio pseudo-estratificado, tendo células mucosas, e apresentam muitas microvilosidades, nas três regiões analisadas, ou seja, nas regiões proximal, média e distal (Figura 48). O espaço luminal, bem como a massa de espermatozóides, aumentam da porção proximal para a distal (Figura 48 a-f).

Nas regiões proximal e intermediária observam-se grânulos de secreção PAS+ nas células epiteliais dos ductos deferentes de jararacas (Figura 49 a,b). Na região ducto deferencial distal de cascavéis, também foram observados grânulos de secreção PAS+ e cabeças de espermatozóides embebidas no epitélio tubular (Figura 49 c). As secreções deste epitélio, parecem brotar das bordas livres das células para o lúmen, e as cabeças de espermatozóides estão orientadas em posição predominantemente perpendicular em relação a elas (Figura 50 a;b e c).

Deste modo, o epitélio e a luz dos ductos deferentes estão mais adaptados para a função de estocagem de esperma do que o epidídimo. Nos dúctulos e ductos epididimários não foram observados massas de espermatozóides e o epitélio apresenta cílios longos (ou microvilos) com um lúmen bastante estreito, evidenciando uma função mais de absorção e transporte do que de estocagem dos espermatozóides.

Figura 47 - **a)** Fotomicrografias de cortes histológicos dos ductulos do epidídimo em *C. durissus* (Dle) e ducto do epidídimo (De), com massas de espermatozóides (★). **b)** Ducto deferente (Dd), proximal com massas de espermatozóides (★) no lúmen, HE, Barra = 10 µm

Figura 48 - (a,b; c) Fotomicrografias de cortes histológicos dos ductos deferentes de *B. jararaca* e *C. durissus* (d,e; f) das regiões proximal, média e distal; Dle I, ductulos epididimários. Ductos deferentes em espermatózoides no lúmen (★). Pregas e convoluções no epitélio dos ductos (→). Fucsina-azul de toluidina, Barra = 90 μm.

Figura 49- **a; b)** Fotomicrografias de cortes histológicos dos ductos deferentes (Dd) de *B. jararaca*, na região proximal e mediana, onde observam-se grânulos de secreção PAS positivos (▸) nas bordas das células epiteliais. **c)** Ducto deferente, na região distal (Dd) de *C. durissus*, com espermatozoides (★) no lúmen com as cabeças próximas as células epiteliais (▸), onde observam-se, grânulos no interior (▸). PAS, Barra = 20 μm

Figura 50 - **a e b)** Fotomicrografia da região proximal e média do ducto deferente de *C. durissus*, onde secreções nas bordas das células epiteliais são observadas (setas) e cabeças de espermatozóides são vistas entre elas (*), PAS, Barra = 20 μ m. **c)** Região distal do ducto deferente de *B. jararaca*, onde secreções (setas), são observadas e os espermatozóides estão orientados em relação a elas (♣) TF, Barra 20 μ m.

4.3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

Os ductos deferentes, na região distal, apresentam-se muito dilatados na época reprodutiva (Figura 51a). As fotomicrografias dos ductos deferentes, nesta região, em ambas as espécies, quando seccionados longitudinalmente, mostraram compartimentos divididos por septos (Figura 52a), estando repletos de espermatozóides (Figura 51b; 52b). Estes compartimentos são formados pela ondulação das paredes do epitélio deferencial, que apresentam muitas dobras (Figura 51c). Em aumento maior, as dobras deste epitélio apresentam microvilos (Figuras 51c e 52c). As dobras e convoluções aqui observadas, permitem o aumento da área de estocagem de esperma nos ductos deferentes.

4.3.3 Ciclos testiculares

O comprimento relativo dos testículos, bem como a variação sazonal dos diâmetros dos ductos deferentes, na região distal, foi analisada, durante as estações do ano, em jararacas ($n = 106$) e em cascavéis ($n = 96$).

Os machos de jararaca apresentam comprimento testicular relativo com variações ao longo do ano, caracterizando-se um ciclo reprodutivo sazonal (Figura 53a). Embora o teste de Kruskal-Wallis, indique não haver diferença significativa entre as estações ($H_{3; 105} = 4,14$; $P = 0,25$), maiores comprimentos relativos dos testículos no verão e outono indicam recrudescência de atividade testicular nesses meses, decaindo no inverno e na primavera (Figura 53a). O teste de comparações múltiplas indica que os valores do verão e outono são significativamente maiores em relação àqueles do inverno e primavera (Tabela 5). Ainda para as jararacas, o diâmetro relativo dos ductos deferentes também apresenta variação ao longo do ano (Figura 53b). Os diâmetros relativos dos ductos são grandes durante o verão e outono,

Figura 51 **a)** Aparelho reprodutor de *C. durissus*, mostrando os testículos (Te), o testículo direito é mais cranial (♣) e os ductos deferentes (setas), Barra = 5 cm. **b)** Micrografia eletrônica de varredura dos ductos deferentes seccionados transversamente, com massas de espermatozóides no lúmen (*). **c)** Epitélio convoluto dos ductos deferentes com espermatozóides (setas), maior aumento (2 µm) do epitélio do ducto deferente, apresentando microvilosidades (*).

Figura 52 **a)** Micrografia eletrônica de varredura dos ductos deferentes *B. jararaca* seccionados transversamente, com massas de espermatozóides no lúmen; aumento maior do epitélio do ducto deferente, indicando estruturas semelhantes a estereocílios. **b)** Aumento maior do ducto com muitos espermatozóides. **c)** Aumento maior do epitélio do ducto mostrando a presença de microvilosidades (setas), (1 µm).

atingindo valores máximos no inverno e os menores valores na primavera (Figura 53b). Mas também não houve diferença significativa entre as estações em relação a este parâmetro ($H_{3; 106} = 6,36$; $P = 0,10$), embora o teste de comparações múltiplas indique diferenças significativas entre as estações, de forma semelhante aos testículos (Tabela 6).

Nos machos de cascavéis, o comprimento testicular relativo também variou ao longo do ano, caracterizando um ciclo reprodutivo sazonal (Figura 54a), com diferença significativa entre as estações ($H_{3; 93} = 11,25$; $P = 0,01$). Mas de forma diferente das jararacas, o comprimento testicular relativo das cascavéis, foi maior na primavera, diminuindo no verão e outono e decaindo significativamente no inverno (Tabela 7). Em cascavéis, os diâmetros relativos dos ductos deferentes mostram intensa variação, com padrão semelhante ao do ciclo testicular, mas com maiores valores no verão, decaindo no outono, apresentando os menores valores no inverno, e voltando a aumentar na primavera, quando são semelhantes aos valores do verão (Figura 54b; Tabela 8).

4.3.4 Variações nos diâmetros dos ductos deferentes

As cópulas em ambas as espécies, foram observadas no final do verão e início de outono, para jararacas e cascavéis, respectivamente. Em cascavéis a cópula é dissociada da época de recrudescência testicular (primavera) com os acasalamentos ocorrendo no final do verão e início de outono, quando o comprimento relativo dos testículos está menor (Figura 54a). Entretanto, os ductos deferentes apresentam diâmetros relativamente grandes (Figura 54b). Assim sendo, provavelmente os machos devem iniciar a estocagem de espermatozóides nos ductos extratesticulares, durante a primavera, quando os testículos são relativamente maiores (veja Figura 54a). A estocagem de espermatozóides deve perdurar pelo verão e outono, quando o diâmetro relativo do ducto ainda é maior (Figura 54b).

Em jararacas, o período de cópula coincide com a recrudescência testicular no verão e outono (Figura 53a). Todavia, nesta espécie os ductos deferentes permanecem repletos de espermatozóides no verão, outono e inverno (Figura 53b), diferentemente do que foi observado em cascavéis.

Deste modo, independentemente da atividade testicular, os machos de ambas as espécies estocam espermatozóides nos ductos deferentes durante a maior parte do ano, só que em cascavéis a espermatogênese inicia-se na primavera e em jararacas no verão. Logo, provavelmente, a estocagem de espermatozóides em cascavéis ocorra da primavera até o outono, e a estocagem de espermatozóides em jararacas ocorre do verão até o inverno (Figuras 53b e 54b), respectivamente.

Figura 53 - Variação sazonal dos testículos e ductos deferentes em *B.jararaca*, durante as estações do ano. **a)** Comprimento relativo do testículo(mm). **b)** Diâmetro do ducto deferente(mm)

Figura 54 - Variação sazonal dos testículos e ductos deferentes em *C.durissus*, durante as estações do ano. **a)** Comprimento relativo do testículo(mm). **b)** Diâmetro do ducto deferente (mm)

Tabela 5 - Medianas dos comprimentos dos testículos (mm)
de *B. jararaca* nas estações do ano. S. Paulo, 2004

	n	Mediana	Mínimo	Máximo
verão	32	32.87	17.19	48.25
outono	35	32.37	16.82	57.45
inverno	18	28.32	15.29	48.91
Primavera	20	28.32	8.57	57.82

Tabela 6 – Medianas dos diâmetros dos ductos deferentes (mm)
de *B. jararaca* nas estações do ano. S. Paulo, 2004

	n	Mediana	Mínimo	Máximo
Verão	32	2.16	0.79	3.99
Outono	35	2.15	1.15	4.64
Inverno	19	2.46	0.63	3.67
Primavera	20	1.79	0.59	2.61

Tabela 7 - Medianas dos comprimentos (mm) dos testículos
de *C. durissus* nas estações do ano. S. Paulo, 2004

	n	Mediana	Mínimo	Máximo
verão	21	33.57	24.07	58.74
outono	35	32.02	19.20	45.62
inverno	13	27.34	21.73	54.98
Primavera	24	38.25	26.06	60.17

Tabela 8 - Medianas dos diâmetros dos ductos deferentes (mm)
de *C. durissus* nas estações do ano. S. Paulo, 2004

	n	Mediana	Mínimo	Máximo
verão	21	3.32	2.28	5.58
outono	36	2.86	1.49	5.10
inverno	13	2.18	0.98	4.01
Primavera	26	3.12	1.28	5.96

4.4 DIMORFISMO SEXUAL EM *C. DURISSUS* E *B. JARARACA*

As fêmeas de *B. jararaca* atingem de comprimento rostro-cloacal (CRC), de $111,4 \pm 2,4$ cm e pesam $569,4 \pm 42,36$ g ($n = 37$). Os machos medem $76,34 \pm 1,7$ cm e pesam $121,2 \pm 116$ g ($n = 41$). Comparando-se os comprimentos e as massas corpóreas, entre machos e fêmeas, observa-se que as fêmeas atingem maiores tamanhos do que os machos ($t = 11,93$ df = 79, $P < 0,0001$) e são muito mais pesadas ($t = 10,90$ df = 76, $P < 0,0001$), (Figura 55).

Em fêmeas e machos de cascavéis no entanto, apesar dos machos atingirem um maior comprimento (CRC), de $99,0 \pm 1,7$ cm ($n = 44$) do que as fêmeas com $98,0 \pm 1,5$ cm ($n = 43$) estes não se mostraram significativos ($t = 0,25$ df = 85, $P > 0,05$). Em relação à massa corporal, foi constatado, que fêmeas e machos pesam $970,4 \pm 49,7$ g e $870,5 \pm 57$ g, respectivamente, não sendo observadas diferenças significativas entre ambos os sexos ($t = 1,321$, df = 85 $P > 0,05$), (Figura 56).

Entre machos e fêmeas de jararacas foram encontradas diferenças significativas entre os dois sexos (ANCOVA $F_{1,75} = 7,46$; $p < 0,01$). Em cascavéis, machos e fêmeas, estas diferenças não foram significativas (ANCOVA $F_{1,84} = 3,31$; $p = 0,07$). Entretanto, quando se comparam valores de fêmeas de cascavéis e jararacas, estas diferenças são muito significativas (ANCOVA $F_{1,77} = 107,4$; $p < 0,01$), da mesma forma, quando se comparam os valores de machos de ambas as espécies a diferença é bastante significativa (ANCOVA $F_{1,85} = 44,32$; $p < 0,01$).

Quando se utiliza o grau de dimorfismo sexual de tamanho (SSD), proposto por Shine (1994), verifica-se que fêmeas de *B. jararaca* são muito maiores do que os machos e apresentam um grau de dimorfismo (0,5), que é expresso como positivo quando as fêmeas

são maiores. Por outro lado, em cascavéis os machos são maiores do que as fêmeas e apresentam um grau de dimorfismo de (-0,01), o qual é expresso como negativo (Figura 57).

Figura 55 - Dimorfismo sexual de tamanho (cm) e massa (g) em machos (■) e fêmeas de (♦) *B. jararaca*

Figura 56 - Dimorfismo sexual de tamanho (cm) e massa (g) em machos (■) e fêmeas de (♦) *C. durissus*

Figura 57 - a) Dimorfismo sexual de tamanho (SSD): machos de *C. durissus* são maiores do que as fêmeas, (SSD = - 0,01). b) Fêmeas de *B. jararaca* são maiores do que os machos, (SSD = 0,5).

4.5 DISTRIBUIÇÃO DOS ESPÉCIMES DE *C. DURISSUS* E *B. JARARACA* NO ESTADO DE S. PAULO.

4.5.1 Dados epidemiológicos

As serpentes *B. jararaca*, recebidas do Estado de São Paulo, no período de 1998 a 2003, no Instituto Butantan, provém principalmente da região metropolitana, particularmente a região sudeste (Figura 58). Os acidentes ofídicos, no mesmo período, atendidos na Instituição, também ocorreram na nessa área, estendendo-se em direção ao sul do Estado, mas com predomínio na região sudeste do Estado de S. Paulo (Figura 58).

As serpentes *C. durissus*, recebidas do Estado de São Paulo, no período de 1998 a 2003, no Instituto Butantan, também se originaram das regiões metropolitanas, especialmente a região sudeste e nordeste (Figura 59). Porém, os acidentes ofídicos aconteceram, principalmente na região metropolitana da Cidade de São Paulo (Figura 59).

Foram registrados 570 casos entre 1991 e 2003 para *Bothrops jararaca* e 108 casos entre 1981 e 2003 para *C. durissus*, sendo que em todos estes acidentes o paciente trouxe o animal, como testemunho. Acidentes ofídicos atendidos no IB, com jararaca perfazem 95,8% do total dos acidentes, enquanto que apenas 4,2% destes acidentes, ocorrem com cascavéis.

Em cascavéis, os machos (adultos e filhotes) causam mais acidentes do que fêmeas (55,7% e 44,3% respectivamente), contudo esta frequência não é significativa ($n = 108$, $X^2 = 0,4066$, $df = 1$, $p = 0,5237$), (Figura 60). Em jararacas, entretanto, observou-se que fêmeas causam mais acidentes do que machos (70,9% e 29,1% respectivamente), e a frequência é significativa ($n = 570$, $X^2 = 5,547$ $df = 1$, $p < 0,01$), (Figura 61).

Figura 58 - Distribuição dos espécimes de *Bothrops jararaca* recebidos no Instituto Butantan, por município e notificação dos acidentes ofídicos, no Estado de São Paulo

Figura 59 - Distribuição dos espécimes de *Crotalus durissus* recebidos no Instituto Butantan, por município e notificação dos acidentes ofídicos, no Estado de São Paulo

Figura 60 - Acidentes ofídicos causados por cascavéis entre 1981 e 2003

Figura 61 - Acidentes ofídicos causados por jararacas entre 1991 e 2003

4.5.2 Atividade anual em jararacas e cascavéis

A atividade anual representada pelo número de acidentes ofídicos, durante as estações do ano, mostra que em jararacas, tanto os machos quanto as fêmeas têm atividade na primavera, verão e outono (Figura 62), decaindo no inverno. Machos de jararacas apresentam maior atividade no verão e outono, possivelmente em decorrência da recrudescência da espermatogênese e do período de procura pelas fêmeas, para acasalamento. Fêmeas de jararacas iniciam sua atividade, na primavera para provável termorregulação devido ao início da gestação, ou para forrageamento, que propiciará a energia necessária para o processo de vitelogênese. No final do verão e início de outono, época dos acasalamentos, ambos os sexos estão mais ativos (Figura 62).

Em cascavéis, as fêmeas mostram aumento de atividade da primavera até o outono, contudo, isto não é pronunciado (Figura 63). Fêmeas e principalmente os machos exibem um grande pico de atividade no outono (Figura 63), provavelmente, em virtude das interações e disputas entre machos, na época do acasalamento, o que não foi observado em machos de jararaca.

Estes dados evidenciam que o padrão de atividade de cascavéis e jararacas é influenciado pelos ciclos reprodutivos, que por sua vez determinam padrões diferenciados para machos e fêmeas nos acidentes ofídicos observados entre as duas espécies. Deste modo, os acidentes crotálicos são causados mais por machos adultos do que por fêmeas, enquanto que os acidentes botrópicos são causados mais por fêmeas (filhotes e adultos) do que por machos.

Figura 62 - Atividades anuais de *B. jararaca*, baseadas em registros de acidentes ofídicos

Figura 63 - Atividades anuais de *C. durissus*, baseadas em registros de acidentes ofídicos

4.7 MODELOS REPRODUTIVOS

B. jararaca e *C. durissus* têm um ciclo reprodutivo sazonal, apresentando uma fase ativa de crescimento folicular; acasalamento e gestação em um ano e uma fase de parturição seguida de quiescência folicular em outro ano, caracterizando um ciclo bienal (Figura 64). Ambas as serpentes têm ciclos reprodutivos similares (Tipo II), com vitelogênese ativa, iniciando em março, ou seja, no final do verão, e finalizando em setembro, na primavera. O período das cópulas é no final do verão e início de outono e é coincidente com a vitelogênese das fêmeas.

Após as cópulas as fêmeas, de ambas as espécies, estocam espermatozóides no útero, durante todo o inverno, através de uma convolução ou dobra, da parede uterina. Esta convolução permanece visível macroscopicamente até a ovulação ocorrer. Os espermatozóides estocados, permanecem viáveis durante todo o inverno no útero, ascendendo para os ovidutos no final da primavera, quando ocorre a fertilização. Nesta fase, as serpentes procuram lugares mais quentes para a sua termorregulação, ficando mais expostas e causando mais acidentes com humanos, principalmente no caso de fêmeas de jararacas (Figura 62). Os filhotes nascem no final do verão em ambas as espécies.

Figura 64 - Ciclo reprodutivo bienal de *C. durissus* e *B. jararaca*. As barras horizontais indicam a duração do estágio reprodutivo

Em machos de *B. jararaca* e *C. durissus*, a atividade testicular foi detectada pelo maior comprimento do testículo, durante as estações do ano (Figura 53 e 54). A estação reprodutiva começa com o início da espermatogênese na primavera e no verão, respectivamente. A espermiogênese apresenta um pico no verão (Figura 66). Porém, a cópula é dissociada desta época, com os acasalamentos ocorrendo nos meses de outono, para ambas as espécies (Figura 66).

Deste modo, os machos de ambas as espécies se preparam para a cópula, estocando esperma nos ductos deferentes (Figura 66). Esta estocagem inicia-se na parte proximal do ducto deferente caminhando em direção à parte distal (Figura 51 e 52).

No início e final do verão os machos, de ambas as espécies, iniciam a procura pelas fêmeas para a realização da corte e acasalamento. Durante esta fase de procura ativa pelas fêmeas, os machos ficam mais expostos e causam mais acidentes com humanos. O custo reprodutivo é alto, devido ao número de capturas e mortes, e isto é bastante pronunciado em machos de cascavéis (Figura 62 e 63). Nesta espécie, outro fator que favorece a exposição é a interação com outros machos, da mesma espécie, para disputa das fêmeas. Estas disputas não causam injúrias graves entre os adversários e são descritos como verdadeiros “rituais de combates”. Durante estes rituais, os combatentes elevam o tronco na vertical (Figura 65 a,b), exibindo-se para o adversário, se entrelaçam e tentam forçar o tronco do adversário para baixo. As lutas entre os machos de cascavéis têm sido observados no final do verão e início de outono, com registros em campo e em cativeiro. Machos de jararacas não foram observados em combates, durante a época de acasalamento. Contudo, em cativeiro (IB), foram observados uma fêmea e dois machos, em tentativa de acasalamento. Os machos apresentaram movimentos ativos, com a cabeça dando voltas serpenteando uns sob os

outros e com freqüente dardejar de língua. Registros de cópulas em (campo e cativeiro), foram observadas no final do verão e início de outono para ambas as espécies (Figura 65 c).

Figura 65 - a e b) Rituais de combate entre machos rivais de cascavéis, na década de 80 e 90 em serpentários, machos elevam-se verticalmente, para competir com o adversário. c) Cópula outonal em cascavel em serpentário (I.B)

Figura 66 – Eventos reprodutivos sazonais e ocorrência de espermatozoides no trato genital de machos e fêmeas de *B. jararaca* e *C. durissus*;
 (—) número baixo de espermatozoides; (—) aumento do número de espermatozoides; (—) número alto de espermatozoides

Discussão

5 DISCUSSÃO

As serpentes *B. jararaca* e *Crotalus durissus* são componentes muito evidentes da maior parte da fauna de serpentes da América do Sul. Elas mostram uma grande diversidade morfológica e ecológica, incluindo tamanho e forma do corpo, “macrohabitat” e dieta.

Crotalus durissus é claramente um ocupante recente do continente Sul Americano, como foi observado por Vanzolini e Heyer (1985). Sequências de DNA mitocondrial mostram que baixos níveis na sequência da divergência entre populações de *Crotalus durissus* são consistentes com a hipótese que esta espécie invadiu a América do sul durante o Pleistoceno, de 1 a 2 milhões atrás, após a formação do istmo do Panamá. O ancestral de todos os *Bothrops* claramente ocupava há muito tempo a América do Sul, antes mesmo da emergência do istmo. Dados disponíveis sugerem que um ancestral comum de todos os *Bothrops* foram os primeiros viperídeos a colonizar a América do Sul, entre 4 -10 milhões antes de quaisquer outros “pitvipers” (WUSTER et al., 2002).

Sob o ponto de vista evolutivo, o conhecimento e a comparação dos ciclos reprodutivos entre as duas espécies (*C. durissus* e *B. jararaca*) é interessante porque permite medir a plasticidade dos modelos reprodutivos empregados por uma serpente de região temperada, cujo ancestral invadiu recentemente a região neotropical e a outra no qual o ancestral já vivia na região tropical, respectivamente.

Em seu monumental trabalho, ALDRIDGE; DUVALL (2002) discorre sobre a evolução da época de acasalamento em “pitvipers” da América do Norte. Ele evidencia como uma determinada época de cópula, associada com a época de espermatogênese; vitelogênese e a estocagem de esperma determinariam o sucesso reprodutivo dos machos e das fêmeas.

5.1 CICLOS OVARIANOS

Vários estudos em serpentes de regiões temperada e tropical, indicam que a ovulação tipicamente ocorre no fim da primavera ou início do verão (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; HARTMANN et al., 2004; JANEIRO-CINQUINI et al, 1993a; SCHUETT, 1992). Apesar de haver similaridades, quanto ao período em que ocorre a ovulação, Aldridge (1979b) descreveu diferenças nos padrões de deposição do vitelo nos folículos ovarianos. Segundo este autor, a deposição folicular (vitelogênese), ocorre em dois tipos básicos: Tipo I - crescimento na primavera e Tipo II -crescimento no verão e outono. No Tipo II, que é observado principalmente em serpentes da região temperada, o processo de vitelogênese é interrompido no inverno quando as serpentes entram em hibernação neste tempo os folículos ovários estão com a metade do tamanho ovulatório (Schuett, 1992). Após a hibernação, a vitelogênese continuaria e finalizaria na primavera. Contudo viperídeos da região tropical também apresentam o Tipo II de vitelogênese (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; HARTMANN et al., 2004).

A vitelogênese em cascavéis e jararacas é sazonal e inicia-se sempre no final do verão e outono caracterizando-se como a do Tipo II, (ALDRIDGE, 1979b). Almeida Santos e Salomão (1999) relataram o caso de uma cascavel morta após 26 anos de cativeiro, que apresentava ainda vários folículos vitelogênicos no outono, indicando que o período da vitelogênese não é perdido em cativeiro.

Os ciclos reprodutivos nas fêmeas são mais complicados, em decorrência das variações encontradas na frequência do ciclo reprodutivo. Tais variações se devem primariamente às condições ambientais, principalmente a temperatura e disponibilidade de

alimentos (DERICKSON, 1976). A alta demanda de energia proveniente da reprodução é influenciada pela quantidade de reservas lipídicas dos corpos das fêmeas e pode resultar em ciclos alternados em serpentes vivíparas (SHINE, 1986; NAULLEAU; BONNET, 1996). Deste modo a frequência reprodutiva é dependente do “status” nutricional das fêmeas (STEARNS, 1992) como é observado em *Vipera aspis* (BONNET et al., 1994) e em algumas cascavéis da região temperada (MACARTNEY; GREGORY, 1988). Apesar de condições favoráveis do clima e abundância de alimentos nos trópicos (FITCH, 1970), o período entre o nascimento, no final do verão, e o início da vitelogênese secundária, no verão/ outono, em *C. durissus* e *B. jararaca* é relativamente curto, prevenindo as fêmeas de ganhar gorduras (SHIROMA, 1993; JANEIRO-CINQUINI et al, 1995). Este ganho é necessário para iniciar o desenvolvimento folicular no mesmo ano, justificando-se portanto um ciclo bienal nos trópicos (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002) e algumas vezes trienal ou quadrienal em viperídeos de regiões temperadas (GIBBONS, 1972; DILLER; WALLACE, 1984; BROWN, 1991; GOLDBERG, 2000).

A proporcionalidade de fêmeas reprodutivas e não reprodutivas, encontradas durante o ciclo reprodutivo neste estudo, reforçam o conceito de bienalidade do ciclo (ALDRIDGE, 1979b; BLEM, 1982). Neste ciclo, dois estágios foram observados: fêmeas em vitelogênese, nas fases ativas e fêmeas não vitelogênicas ou em fase quiescente, respectivamente. E estas últimas estarão em vitelogênese (fase ativa) só na estação reprodutiva seguinte. Por outro lado, o ciclo em ambas as espécies é considerado bienal, não apenas porque o tempo é limitado para suprir as reservas de gordura, mas também porque para a completar o ciclo, desde a vitelogênese até a parturição são necessários dois anos, como ocorre em outros viperídeos (MARTIN, 1992). A bienalidade dos ciclos para jararacas e cascavéis já foi proposta por outros pesquisadores (LANGLADA, 1972; SAZIMA, 1992; ALMEIDA-

SANTOS; ORSI, 2002) e recentemente foi corroborada por Almeida Santos et al.(2004), para cascavéis, tendo como base a influência hormonal no ciclo reprodutivo.

O ciclo ovariano das cascavéis e jararacas está sob a influência dos hormônios estrógeno e progesterona (PORTO, 1941; VALLE e VALLE, 1943; ABDALLA, et al., 1996 e ALMEIDA-SANTOS, et al., 2004) e neste trabalho. A presença de estradiol (estrina) foi demonstrada em folículos ovarianos vitelogênicos, tanto de cascavéis como de jararacas por Fraenkel; Martins (1939). As cascavéis e jararacas em vitelogênese primária (V1), apresentam folículos, pequenos e esbranquiçados. A análise dos cortes histológicos destes folículos em microscopia de luz, evidenciou a falta de grânulos de vitelo. E neste estágio (V1), os níveis de estrógenos e progesterona são baixos, quando comparados a outros estágios. Em vitelogênese secundária (V2), os folículos ováricos iniciam a deposição de vitelo, com os grânulos PAS+; as células da granulosa estão ativas, e apresentam ainda uma zona pelúcida bem caracterizada. Os níveis de estrógenos são elevados e significativamente maiores do que na vitelogênese primária (V1).

Uma das funções atribuídas aos estrógenos é a indução da síntese e secreção de viteloproteínas pelo fígado (DESSAUER, 1970; YARON; WIDZER, 1978). Deste modo, provavelmente a relação encontrada entre a vitelogênese e o estrógeno determinaria o crescimento folicular em ambas as espécies, estudadas. Por outro lado, o estradiol, secretado pelo ovário durante a vitelogênese é a principal substância que controla o desenvolvimento do oviduto para a prenhez ou gestação (GIRLING, 2002). Observou-se neste trabalho, ainda um aumento de progesterona secretada em V2, em relação à fase anterior (V1). Este aumento de progesterona poderia estar relacionado ao crescimento do epitélio ovidutal (GIRLING, 2002). Na fase ovulatória (OV) do ciclo, observa-se uma queda significativa no nível de estrógenos. Esta queda de estrógenos é observada durante toda a gestação. Por outro lado, se observa um aumento significativo de progesterona, que se mantém alta durante todas as fases da gestação.

Coincidente com o provável estabelecimento da placenta corioalantóica, no estágio 20 do desenvolvimento embrionário, observou-se que os níveis de progesterona são bastante altos, e se mantêm assim até o final da prenhez. Nas serpentes pós-parto (PP), o nível de progesterona cai, mas o nível de estrógeno permanece o mesmo da fase anterior.

Em *C. durissus* o estradiol muda significativamente durante o ciclo reprodutivo, aumentando no outono, durante o período de acasalamento. Mostra um pico no inverno, quando a vitelogênese progride e cai significativamente quando a fertilização ocorre (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004). O 17β -estradiol tem sido descrito como um promotor de mobilização de reservas maternas para a vitelogênese em *Vipera aspis* (BONNET et al., 1994; 2001), indicando que este esteróide pode ter a mesma função em cascavéis e jararacas, levando-se em conta aspectos similares de sua ecologia reprodutiva, como viviparidade e estocagem de esperma (ANDRÉN et al., 1997). Dosagens exógenas de estradiol também influenciam a reprodução em répteis, causando hipertrofia ovidutal, aumento do número de glândulas de muco, atividade secretória ovidutal e vascularidade (MEAD et al., 1981; GIRLING, 2002).

Progesterona, por outro lado, tem sido vista como uma antagonista do estradiol, inibindo a vitelogênese via “feedback” negativo, e esta correlação, foi sugerida em *V. aspis* por Bonnet et al., (2001). Em *C. durissus* a progesterona caiu significativamente no outono, coincidente com o início da vitelogênese secundária e o aumento de estradiol. Na primavera, quando a ovulação e a fertilização ocorrem, a progesterona aumenta rapidamente e permanece alta durante toda a gestação (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004). A relação entre ovulação, prenhez e altos níveis de progesterona tem sido observada em *V. aspis*, (MEAD et al., 1981; MASSON; GUILLETE, 1987; NAULLEAU; FLEURY, 1990), e neste trabalho.

O fato de que altos níveis de progesterona podem agir como um inibidor da vitelogênese na presença de baixos níveis de estradiol, pode ser considerado. Isto quando se

analisa a importância do balanço hormonal na atratividade das fêmeas ou a possibilidade de neo-aquisição de lipídios, utilizáveis para síntese de esteróides, por meio das reservas corporais. Isto permite às fêmeas se engajarem em um outro ciclo reprodutivo, principalmente nas serpentes pós- parto.

Na ausência de vitelogênese, o estradiol que medeia a transformação da gordura abdominal, no fígado, em vitelogenina, deixa de atuar. Deste modo, a vitelogenina que age como feromônio, estimulando os machos para a corte e o acasalamento, por meio de sua liberação entre as escamas (CREWS; GARSTKA, 1982) não seria liberada. Conseqüentemente, serpentes pós – parto não seriam atrativas, em decorrência do alto nível de progesterona que inibiria o crescimento folicular. Por seu turno, serpentes em vitelogênese primária (V1), apresentando níveis baixos de progesterona mas com um modesto aumento dos níveis de estradiol, poderiam estar atrativas para os machos. Fêmeas de *Bothrops neuwiedi pubescens*, acasalam quando estão em vitelogênese primária (V1), no outono, e estocam espermatozóides no útero até a estação reprodutiva seguinte (verão), quando entram em vitelogênese ativa (V2), sendo que os nascimentos ocorrem apenas na estação seguinte (verão), (HARTMANN et al., 2004).

Em fêmeas de cascavéis e jararacas, o período de vitelogênese ativa, com altos níveis de estradiol, é coincidente com a época da cópula. A procura pelas fêmeas reprodutivas (atrativas), aumenta a atividade dos machos no verão e no outono, propiciando aumento de interações entre os machos de cascavéis (rituais de combate). Favorece também o encontro entre machos e fêmeas, em ambas as espécies, para fazer a corte e o acasalamento. As cópulas ocorrem nos meses de março até maio (verão e outono), para ambas as espécies.

A maior parte dos estudos em populações de viperídeos, nos gêneros (*Crotalus* e *Sistrurus*), indicam que o tempo de acasalamento para viperídeos da região temperada não é uniforme (ALDRIDGE; DUVALL, 2002). Assim sendo, dentro do modelo de acasalamento

outonal, emergem duas modalidades básicas: unimodal [verão (outono) somente] ou bimodal [verão (outono) e primavera] (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; SCHUETT, et al., 2002). Em espécies que exibem um modelo unimodal, fêmeas têm estocagem de esperma obrigatória (SCHUETT, 1992; ALDRIDGE; DUVALL, 2002; SEVER; HAMLETT, 2002).

As cascavéis e jararacas apresentam um padrão unimodal de acasalamento e, deste modo, existe uma obrigatória estocagem de esperma pelas fêmeas, como já foi descrito por Almeida-Santos; Salomão (1997; 2002).

Em serpentes de região temperada, o armazenamento de esperma no oviduto, particularmente no útero, é um importante mecanismo, pois permite preencher o lapso entre a cópula de outono; a interrupção da vitelogênese no inverno, e a fertilização de primavera. Os eventos ocorrem de modo que os nascimentos aconteçam numa estação mais favorável do ano, no que diz respeito aos rigores climáticos (temperatura) e às chances maiores de obtenção de alimentos (SCHUETT, 1992). Uma das hipóteses para a interrupção da vitelogênese no inverno, em serpentes de regiões temperadas, é que o período de nascimento (final do verão) foi temporariamente fixado, e assim a sobrevivência dos filhotes foi maximizada. Conseqüentemente, se a duração da gestação e vitelogênese também foram fixadas, a vitelogênese tem que ser iniciada no verão prévio, para que os nascimentos aconteçam, no tempo mais favorável (ALDRIDGE; DUVALL, 2002). Curiosamente, este padrão observado nas serpentes do hemisfério norte, também foi relatado para a cascavel neotropical *Crotalus durissus*, apesar das condições climáticas mais amenas e da abundância de presas encontradas nesta região ao longo de todo o ano. Além disso, as fêmeas também estocam espermatozóides (SALOMÃO et al., 1995; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997).

Entretanto, a exata localização de armazenamento deste esperma, quer em estruturas especializadas como os receptáculos ou mesmo no infundíbulo, anteriormente ao útero ou

ainda no próprio epitélio uterino, também é bastante discutida (FOX, 1956; HOFFMAN; WIMSATT, 1972; HALPERT et al., 1982; SCHUETT, 1992; SEVER; HAMLETT, 2002; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997, 2002).

5.2 ESTOCAGEM DE ESPERMA EM FÊMEAS

Um dos aspectos controversos e pouco compreendidos do mecanismo de estocagem de esperma é a questão da sobrevivência do espermatozóide nesses longos prazos. O espermatozóide, na maioria dos vertebrados mamíferos, apresenta uma sobrevivência curta enquanto em outros grupos, tais como as aves e répteis o espermatozóide pode sobreviver desde horas até anos no trato reprodutivo das fêmeas, (FOX, 1956; MAGNUSSON, 1979) o que garante grande sucesso reprodutivo das espécies. Alguns autores sugerem que receptáculos, presentes na região infundíbular ou no útero, de alguma forma, propiciariam nutrição e “refúgio” químico aos espermatozoides (FOX 1956; HOFFMAN; WIMSATT, 1972; HALPERT et al., 1982).

O armazenamento de esperma pode ocorrer imediatamente ou após algumas horas da cópula, na região posterior do útero, ou na vagina (LUDWIG; RAHN, 1943; ANDRÉN; NILSON, 1987; HALPERT et al., 1982; SCHUETT, 1992; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997, 2002), de modo a conter “in útero” o esperma durante o período de inverno até a fertilização de primavera.

Os ovidutos de cascavéis e jararacas apresentam três regiões: infundíbulo, útero subdividido em anterior e posterior e vagina.

A região posterior do oviduto, a qual leva para a abertura comum ou urogenital é chamada vagina (GIRLING et al, 2002). A vagina é uma região muscular forte que age como um esfíncter durante a gestação (GIRLING, 2002). O epitélio é fortemente ciliado (SEVER et al, 2002). Células ciliadas podem ajudar no transporte de esperma, movimento de muco ou de

fragmentos liberados do oviduto, e este epitélio contém ainda numerosos grânulos secretores (GIRLING et al., 2000). Em jararacas e cascavéis as vaginas são amplas e bilobadas e possuem forte musculatura, que é diferenciada daquela do restante do oviduto. O epitélio é ciliado e secretor, e reage positivamente a PAS e Alcian Blue, como já foi descrito para outras serpentes (GIRLING et al., 2000). O muco produzido pelas células mucosas, provavelmente tenha papel trófico de nutrição dos espermatozóides. O epitélio é bastante ciliado, e provavelmente auxilia no transporte deste muco e do próprio espermatozóide em direção ao útero. As porções posteriores da vagina, estreitam-se abruptamente, abrindo-se para os úteros posteriores. Em fêmeas de cascavéis e jararacas em vitelogênese ativa, os espermatozóides foram encontrados no lúmen do útero posterior e entre as suas pregas. Nesta fase, o útero, de ambas as espécies é caracterizado por uma torção, tomando a forma de uma espiral formada pela contração das camadas musculares externas, assim permanecendo até a ovulação ocorrer. A microscopia eletrônica de varredura da superfície interna do útero, mostra dobras internas longitudinais que acompanham a forma anatômica espiralada. Sendo que estas pregas também foram visualizadas em microscopia de luz. Desta forma, a configuração anatômica convoluta da musculatura uterina, em ambas as espécies, corroborada pela M.E.V. favoreceria a manutenção dos espermatozóides, restrita ao útero posterior. Os resultados da comparação entre os epitélios uterinos em M.E.V, M.E.T e M.L., evidenciam que o útero posterior é constituído por epitélios ciliado e mucoso. Estes epitélios seriam próprios para a manutenção e estocagem de esperma em ambas as serpentes, produzindo secreções e distribuindo-as por meio do movimento ciliar. A associação íntima entre os espermatozóides e o epitélio ciliado, aqui descrito, pode estar relacionada com a secreção de muco que nutriria os espermatozóides durante todo o período de estocagem, até a ocorrência da ovulação. O muco e a matriz carregadora, aqui encontrado, podem está associados com a sobrevivência e a condução dos espermatozóides durante e após a estocagem. Deste modo, os resultados da ultraestrutura e da

microscopia de luz, evidenciam que tanto em *C. durissus* como em *B. jararaca*, a estocagem de espermatozoides está relacionada à mudança conformacional do útero que torna - se contraído e convoluto, formado por dobras e espirais. Essa retém fisicamente os espermatozoides, durante todo o inverno.

O útero posterior apresentou-se contraído para estocar espermatozoides, mas se observou que permanece dilatado antes e após o processo de parturição (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997) e neste trabalho. Tais características indicam que o útero posterior tem função similar à cérvix, (*cervix*) uterina, descrita em mamíferos, como uma função semelhante a um esfíncter, projetando-se posteriormente dentro da vagina (HAFEZ, 1993).

Em *Crotalus durissus* a formação da torção muscular uterina (UMT), que permite a estocagem de espermatozoides por um longo prazo, é um processo modulado pelo balanço entre os níveis plasmáticos de estradiol e progesterona de fêmeas em vitelogênese, a qual pode ser favorecida pela presença de arginina- vasotocina (AVT) (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004). Da mesma forma a sua manutenção por quatro meses aproximadamente, parece ser beneficiada em condições de altos níveis de estradiol e baixos níveis de progesterona. Isto porque altos níveis de estradiol estão relacionados com a deposição de vitelo nos folículos ovarianos, enquanto os baixos níveis de progesterona podem permitir a continuidade da contração uterina. Por outro lado, a presença de AVT inferida pela quantidade de cistina aminopeptidase (CAP) circulante, parece também desempenhar um papel importante tanto na formação, mas principalmente na manutenção da contração uterina (YAMANOUYE et al., 2004), para a estocagem de espermatozoides durante todo o inverno.

5.3 FERTILIZAÇÃO

Na primavera, as fêmeas não apresentam mais as regiões uterinas posteriores contraídas ou convolutas. Os espermatozóides devem iniciar portanto movimentos ascendentes, em direção à região infundibular, onde ocorrerá a fertilização. O local de fertilização em répteis, não tem sido determinado, contudo a fertilização ocorre presumivelmente antes do oócito ser coberto pelo albúmen ou pelas membranas da casca (GIRLING, 2002). Ovos são cobertos com secreções ovidutais logo que entram no óstio do infundíbulo. Isto sugere que a fertilização ocorre principalmente no infundíbulo ou na tuba uterina e a estocagem de esperma tem sido observada sempre nestas duas regiões (GIRLING, 2002). Sulcos e pregas que compõem os ramos do espaço luminal, no infundíbulo, assemelham-se a tubos e são denominados de receptáculos de esperma. A morfologia destes receptáculos tem sido extensivamente discutida (FOX, 1956; HOFFMAN; WINSATT, 1972 e HALPERT et al., 1982). Infelizmente, não se conhece adequadamente, o mecanismo pelo qual os espermatozóides são liberados dos sítios de estocagem, qualquer que sejam estes, por exemplo, vagina, útero ou infundíbulo. E nem se sabe se o oviduto tomaria parte dos movimentos do esperma em direção ao “site” da fertilização. Por outro lado, as matrizes carregadoras de esperma que são uma secreção de origem ovidutal (PAS+) + esperma, propostas por HALPERT et al (1982) para conduzir os espermatozóides no lúmen ovidutal, poderiam talvez desempenhar esta função. Neste trabalho, foram identificadas aquelas matrizes carregadoras, porém se elas efetivamente tem este papel, estudos futuros poderiam dirimir estas dúvidas.

A maior parte da região anterior do oviduto, o infundíbulo, tende a ser delgado e flácido, o que concorda com as descrições da literatura em geral para répteis (GIRLING,

2002). O infundíbulo recebe os ovos recém-ovulados do ovário, via o seu óstio anterior, em forma de funil, abrindo-se para a cavidade abdominal. Antes da ovulação, o infundíbulo migra em direção ao ovário onde o óstio envolve o oócito em desenvolvimento. Este processo tem sido observado em diversos escamados (CUELLAR, 1970) e pode ser que o óstio seja idealmente colocado para receber os ovócitos recém-ovulados. O epitélio luminal do óstio infundibular anterior é formado predominantemente de células ciliadas. Se estas células têm alguma função no posicionamento do óstio em volta do oócito, recém ovulado não se tem conhecimento suficiente. Tanto em cascavéis como em jararacas foi observado que o mesoviduto do óstio infundibular posiciona-se muito próximo ao ovário, no período de ovulação, caracterizando que possa haver migração do oviduto em direção ao ovário. Contudo, não está esclarecido se o próprio oviduto estaria diretamente envolvido ou não na estimulação do processo de ovulação (GIRLING, 2002).

O infundíbulo ovidutal de ambas as espécies possui células ciliadas e não ciliadas, Segundo Girling (2002) o infundíbulo é obviamente uma região secretora, mas pouco é conhecido sobre a natureza das secreções por ele produzidas. A função dessas secreções, outrossim, não tem sido investigada. Células não ciliadas do epitélio infundibular reagem positivamente à detecção de carboidratos, (GIRLING, 2002). Em várias espécies de lagartos a coloração positiva para carboidratos corresponde aos numerosos grânulos, que variam em densidade eletrônica, verificada na região apical das células epiteliais do oviduto (GIRLING, 2002). Protrusões apicais são idealmente posicionadas para secretar materiais diretamente para o ovócito recém ovulado, antes de este ser envolvido por albúmem e membrana da casca (GIRLING, 2002). As regiões infundibulares de *Crotalus* e *Bothrops*, macroscopicamente, se apresentam com muitas pregas, sendo bastante evidenciadas na M.E.V. Os epitélios que recobrem a região infundibular mostraram-se entremeados por células ciliadas e não ciliadas, tendo muitas células mucosas, Segundo Hafez (1993) a taxa de cílios é afetada pelos níveis

hormonais, atingindo o pico de atividade máxima nas fimbrias do infundíbulo durante a ovulação. Células ciliadas foram observadas em grande número, predominantemente no ápice das dobras das mucosas, tanto em cascavéis como em jararacas, durante a fase ovulatória quando os níveis de estradiol são altos. Entretanto, na região infundibular, propriamente dita, não foram observados tantos cílios e observou-se um predomínio maior de células mucosas. Deste modo, a captação do folículo ovariano, está associada a uma maior porcentagem de cílios, e também de células secretoras, as quais são abundantes onde os fluidos luminais são requeridos para a interação entre ovos e esperma (HAFEZ, 1993).

5.4 PLACENTAÇÃO

Após a fertilização, os ovos iniciam o desenvolvimento embrionário em câmaras uterinas, separadas por constrições, que funcionam como verdadeiras “implantações”, limitando o movimento dos ovos (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; BLACKBURN, 1998). Em ambas as espécies, aqui estudadas observa-se uma íntima aposição do útero com as membranas extra-embrionárias, caracterizando-se a placenta corioalantóica de répteis antes descritas por (Mossman (1937); Blackburn (1993). A fusão do alantóide com o córion é quem determina o estabelecimento da placenta, devendo ocorrer no estágio 20 de Zehr (1962), para ambas as espécies.

Nos mamíferos, a placenta é bem conhecida como órgão endócrino, mas em répteis há poucas considerações do potencial da placenta reptiliana para a síntese de hormônios esteróides (GIRLING, 2002). A viviparidade providencia uma oportunidade única para investigar os caminhos pelos quais o controle endócrino da gestação tem sido modificado pela seleção natural, desde os primórdios da transição do modo reprodutivo em répteis. Provavelmente, durante a evolução da viviparidade espera-se ocorrer um aumento do nível do

hormônio progesterona, mais do que do estradiol (BONNET et al., 2001). O alto nível de progesterona plasmática encontrada em cascavéis é associado ao ciclo reprodutivo, desde a fase ovulatória até a gestação final. E mostra o quanto se desconhece do controle endócrino destas serpentes. Ambas as serpentes, possuem corpos lúteos, que permanecem por toda a gestação. O aumento de progesterona seria proveniente deste corpo lúteo ou da própria placenta estabelecida? Em *Chalcides* (lagarto vivíparo), a progesterona foi produzida “in vitro”, por tecidos placentários (GUARINO et al., 1998). Deste modo existe um potencial de produção de hormônios por tecidos placentários que precisa ser esclarecido.

A placenta corioalantóica, em *C. durissus* e *B. jararaca*, é epiteliocorial, difusa, adecídua e altamente vascularizada. Este tipo de placenta é acompanhado de permuta de gases materno-fetais, e possivelmente de transferência de pequenas quantidades de nutrientes orgânicos e inorgânicos (WEEKES, 1935, BLACKBURN, 1993a). As trocas de gases placentárias, ou mesmo de nutrientes, presumivelmente são aumentadas pelo adelgaçamento dos tecidos, uterinos e coriônicos os quais estão locados entre os capilares fetais e maternos. A membrana da casca é fina, e provavelmente não intervêm no processo das trocas fisiológicas, em ambas as espécies.

O cordão umbilical, que está relacionado com o transporte de substâncias materno-fetais, em cascavéis e jararacas, é formado por duas artérias e uma veia umbilical, e uma artéria e veia vitelínica, além do ducto do alantóide. Existem poucos trabalhos de placentação reptiliana que se referem à vascularização das membranas placentárias (YARON, 1985). As artérias e veia umbilicais suprem a alantoplacenta em ambas as espécies, assim como as artérias e veia vitelínicas suprem o saco do ovo (vitelo). Os vasos vitelínicos ramificam-se sobre a parte dorsal do saco do ovo, todavia não penetram nele profundamente, como foi observado em outras espécies de répteis por Weekes (1930).

A alantoplacenta ou placenta corioalantóica em Squamatas, são classificadas usualmente de acordo com o sistema estabelecido por Weekes (1935) a qual reconheceu três morfotipos que foram definidos por duas grandes características: o grau de pregas formadas entre os tecidos coriônicos e uterinos e a anatomia das células e tecidos da interface materno-fetal. As morfologias dos dois tecidos, afetam a natureza e a extensão das trocas fisiológicas de nutrientes que atravessam a placenta (BLACKBURN, 1993a). Em ambas as espécies, na região mesometrial, todo o epitélio do lúmen uterino está elevado em pregas (cristas) rasas, consistindo de capilares revestidos por uma fina camada do epitélio uterino. O epitélio coriônico é relativamente mais cuboidal do que escamoso, e forma uma camada contínua justapondo-se ao epitélio uterino. As pregas do epitélio uterino se interdigitam com as pregas do epitélio corioalantóico. Foi observado, que as pregas do epitélio coriônico invadem extensamente as pregas do epitélio uterino, aumentando, deste modo, a área disponível para trocas fisiológicas. Estas pregas, em ambos os epitélios, estão associadas aos epitélios de transporte, assim como são uma especialização para o aumento da área de superfície em uma variedade de tecidos de vertebrados (STEWART; THOMPSON, 2000). Vasos sangüíneos, em grande número, estão presentes na base destes epitélios, permitindo que o suprimento do sangue materno fique bem próximo para o suprimento do sangue fetal. O epitélio uterino é formado por células cúbicas, que apresentam cílios nas interfaces materno - fetais. Os materiais presentes no lúmen, reagem positivamente com PAS, sendo provavelmente secretado pelo epitélio uterino. Muitos grânulos foram observados no epitélio coriônico, (lado fetal) de jararacas e cascavéis. No lado fetal, os grânulos destas células, coraram intensamente com o PAS, indicando, possivelmente, a passagem de nutrientes maternos. Estas características, presentes nas interfaces materno - fetais, podem ser interpretadas como adaptações para aumentar as trocas nutricionais, caracterizando uma forma incipiente de placentotrofia em ambas as espécies de serpentes.

Em escamados são observadas duas vias de provisão para os embriões. A primeira delas é a “lecitotrofia” – na qual os embriões recebem os nutrientes predominantemente do ovo suprido durante a vitelogênese. A maior parte dos répteis (ovíparos e vivíparos) exibe lecitotrofia. Os suprimentos de nutrientes via placenta, é denominado placentotrofia e é exibido somente em poucas espécies reptilianas estudadas, (BLACKBURN et al., 1984; STEWART; THOMPSON, 2000). A maior parte das serpentes vivíparas são predominantemente lecitotróficas contudo, todas as espécies vivíparas são placentotróficas em algum grau (STEWART; THOMPSON, 2000). Assim sendo, os dados aqui apresentados concordam com os estudos recentes de Stewart e Thompson (2000), indicando um grau marcante de placentotrofia para as serpentes lecitotróficas aqui estudadas.

Weekes (1935), no entanto, sugeriu que a maioria dos tipos de placentas reptilianas são principalmente órgãos respiratórios, outras suprem o embrião de água, enquanto as mais especializadas (Tipo III), têm função nutritiva (BLACKBURN, 1993b; 1998). Weekes (1935) também sugeriu que a placenta do Tipo III em répteis, estaria invariavelmente associada aos ovos com pouco vitelo. Recentemente, BLACKBURN; VITT (2002) descreveram uma complexa placenta (Tipo IV), em um lagarto sul americano *Mabuya*, o qual ovula com um ovo pequeno e sem vitelo, medindo apenas 1 mm.

O Tipo III de placenta foi descrito pela primeira vez na família Viperidae, em *Vipera berus*, serpente da região temperada, por Bellairs et al., (1955). Contudo, não foram apresentadas fotografias, de cortes histológicos, que confirmassem a descrição deste morfotipo. Em vista desta limitação, muitos pesquisadores não concordam com esta classificação (YARON, 1985; BLACKBURN, 1993). Entretanto, há semelhança morfológica na descrição da placenta de *Vipera berus* e as de *Bothrops* e *Crotalus*, aqui descritas. As mesmas, não apresentaram uma área especializada na região mesometrial (placentomas), descrita originariamente como o Tipo III de placentação no lagarto *C. chalcides* (WEEKES,

1935). Deste modo, a placentação em ambas as espécies, aqui estudadas, é classificada como do Tipo II de placentação, seguindo o critério de Weekes (1935), revisado por Blackburn (1993), e, redefinido por STEWART; THOMPSON (1994). A placentação de crotalíneos, apresentando características do Tipo II, de placenta foi descrita recentemente em cascavéis por Almeida-Santos et al., (2003) e neste trabalho.

Estudos mais recentes têm diversificado o conhecimento da nutrição embrionária de estruturas placentárias. Isto tem resultado em hipóteses para a transição evolucionária da placentotototrofia, mas tais dados estão disponíveis para poucas espécies (Stewart e Thompson, 2000).

De um modo geral, entretanto, as placentas corioalantóicas (Tipo I e II), estão associadas a ovos com bastante vitelo (BELLAIRS et al., 1955; STEWART, 1989), sendo as fêmeas predominantemente lecitotróficas. Dentre as membranas extraembrionárias o saco do ovo (onfalopleura), também denominado de membrana coriovitelínica, contribui para a formação da placenta coriovitelínica (STEWART; THOMPSON, 2000). Esta placenta tem importante função na mobilização de alimentos para o embrião, durante os estágios iniciais de desenvolvimento dos escamados (STEWART; THOMPSON, 2000). Em cascavéis e jararacas, o saco vitelínico é utilizado presumivelmente nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário para a nutrição do embrião. Entretanto, nas fases seguintes do desenvolvimento, foi observado que apesar da placenta corioalantóica encontrar-se já estabelecida, a quantidade de vitelo era ainda substancial. E no final do desenvolvimento, o saco vitelínico foi retraído para dentro da cavidade do corpo do feto, nas duas espécies. Deste modo, a grande quantidade de gordura vitelínica remanescente da mãe, representa agora reserva nutricional para o recém nascido.

5.5 NASCIMENTO DOS FILHOTES

Após o nascimento, filhotes de cascavéis e jararacas apresentam dois tipos de gordura em sua cavidade abdominal: abdominal e vitelínica. Esta última é oriunda do saco vitelínico do feto. Em filhotes mais velhos, a gordura vitelínica apresentou-se como um tipo de reserva que é prontamente consumida nos primeiros dias após o nascimento, já a gordura abdominal não é disponibilizada tão rapidamente aos recém-nascidos (OLIVEIRA et al., 2004). Porém, os filhotes de ambas as espécies podem contar com as duas fontes de energia no início da vida.

Filhotes de cascavel e jararaca nascem no final do verão, início de outono (SALOMÃO et al., 1995; ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2001) e neste trabalho, quando tem início a estação fria. Em virtude disto, a gordura vitelínica, armazenada, providenciaria uma fonte adicional de suprimento nutricional para o filhote, nos primeiros meses de vida.

5.6 TÁTICAS REPRODUTIVAS

Em fêmeas de serpentes a fecundidade está relacionada ao tamanho da mãe (SEIGEL; FORD, 1987; SHINE, 1980). Em ambas as espécies, foram encontradas uma correlação positiva entre o número de filhotes e o comprimento da mãe.

As fêmeas das duas espécies, todavia, apresentam diferenças no modo como utilizam o investimento reprodutivo: a jararaca investe em maior número de filhotes, porém menores, ao passo que a cascavel produz filhotes maiores e em menor número. Tais diferenças podem estar relacionadas ao tipo de alimento utilizado pelas espécies, uma vez que filhotes de jararacas alimentam-se de presas ectotérmicas e os de cascavéis ingerem pequenos mamíferos

– um tipo de presa geralmente de porte avantajado em relação àquelas usadas por filhotes de jararacas. De acordo com Sun et al., (2002) o tamanho dos filhotes também é afetado pela seleção por exemplo: tamanhos de presas grandes favorecem o aumento do tamanho neonatal e por alocação de “trade-offs” ou seja, grandes ninhadas são compostas de pequenos filhotes King (1993).

A massa da ninhada em serpentes pode também estar relacionada a diferentes estratégias de forrageamento das espécies. Os gêneros *Bothrops* e *Crotalus* forrageiam de espreita, mas em representantes de *Bothrops* o forrageamento ativo também pode estar presente, principalmente em representantes com corpo mais delgado como a jararaca (SAZIMA, 1992). Carregar ninhadas pesadas pode representar custos energéticos e de sobrevivência desnecessários, e em jararacas uma ninhada mais leve pode ter sido selecionada. Fêmeas de jararacas (adultas ou filhotes) são bastante ativas, provavelmente devido a atividade de forrageio, maior do que nos machos, e permanecem mais expostas. Esta maior atividade nas fêmeas de jararaca, em relação às cascavéis, pode ser evidenciada pelo maior número de encontros com seres humanos, e conseqüentemente haverá um número maior de acidentes ofídicos e capturas, em comparação às fêmeas de cascavéis.

Fêmeas de jararacas atingem comprimentos maiores do que as cascavéis e o seu investimento reprodutivo é maior em relação ao número de filhotes. No entanto, cascavéis apresentam massas corpóreas maiores, com um número reduzido de filhotes, contudo bem maiores do que os filhotes de jararacas.

Em cascavéis, os machos são maiores e bem mais ativos do que as fêmeas, e em conseqüência deste comportamento, ficam mais expostos, comparativamente às fêmeas. O pico de atividade observado em machos, no outono, pode ser explicado pela época de acasalamento, na qual, os machos além de serem mais ativos, procuram intensamente pelas fêmeas reprodutivas (atrativas) e durante esta busca podem ocorrer diversos tipos de

interações sociais, ou seja: rituais de combate, disputas por fêmeas, cortes, acasalamentos e comportamento de guarda (vigília), (ALMEIDA-SANTOS et al., 1999). Tais características, aumentariam os encontros com humanos propiciando maior captura ou acidentes ofídicos (ALMEIDA-SANTOS et al., 2002). Contrariamente, porém, tais características parecem não ocorrer em machos de jararaca, onde estas atividades não foram tão pronunciadas. E a julgar por este padrão, não procuram ativamente pelas fêmeas.

Comparando-se estas atividades, entre as duas espécies, as fêmeas de jararacas e machos de cascavéis tem um custo reprodutivo maior. Os resultados observados, aqui, indicam haver uma correspondência entre os aspectos comportamentais, alimentares e reprodutivos dessas serpentes, com os acidentes provocados por elas.

Em ambas as espécies aqui estudadas em termos dos aparelhos reprodutores, observam-se similaridades nas estruturas e aspectos morfofuncionais dos órgãos, tais como: vitelogênese sazonal, estocagem de esperma no útero, fertilização na região infundibular do oviduto, gestação uterina, presença de placentação e de especializações para a placentrotrofia. Conclui-se, desse modo que houve uma evolução convergente entre elas, em acordo com as propostas de Blackburn (1998), para estas características ovidutais.

Por outro lado, o modelo reprodutivo de cascavéis e jararacas, aqui apresentado mostra fortes similaridades com as crotalíneas da região temperada (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; SCHUETT, 1992). Nas fêmeas a época de acasalamento é temporariamente dissociada da época da fertilização, e igualmente em machos, a cópula é dissociada da espermatogênese. Em função desta assincronia, ambos os sexos estocam espermatozóides em seus tratos reprodutivos. E o período de vitelogênese e a espermatogênese em ambas as espécies é sazonal e aparentemente foi fixado em crotalíneos, como foi sugerido por Aldridge; Duvall (2002) por um provável ancestral de viperídeo, que habitava a região temperada.

5.7 CICLOS REPRODUTIVOS MASCULINOS

Machos de *Bothrops* e *Crotalus* apresentam dois testículos alongados, que se comunicam com a cloaca através dos ductos deferentes. Não se conhece, todavia, como o esperma é direcionado para os ductos deferentes e qual o a função da via espermática.

Em serpentes o esperma é transportado dos testículos por meio dos ductos eferentes, os quais podem fazer anastomose, diretamente dos túbulos seminíferos para os túbulos do epidídimo (VOLSOE, 1944). Segundo Guibé (1970), esta ligação entre os túbulos seminíferos e os vasos deferentes é assegurada por 3 tipos de canais, os canalículos eferentes testiculares (dúctulos eferentes do testículo), os canalículos epididimários (dúctulos do epidídimo) e o epidídimo (ductos epididimários propriamente ditos). Os dúctulos eferentes são facilmente distinguíveis dos túbulos do epidídimo pela falta de estereocílios e por uma grande quantidade de tecido conjuntivo estrutural (BAUMAN; METTER, 1977). Os epidídimos das serpentes são compostos de duas partes, dúctulos do epidídimo (porção proximal e distal) e ducto do epidídimo (VOLSOE, 1944; FOX, 1977; BAUMAN; METTER, 1977). A junção do dúctulo epididimário com o ducto do epidídimo é muitas vezes abrupta e isto foi observado em serpentes, (Colubrídeos), por Bauman e Metter (1977). Entretanto, a junção entre os túbulos seminíferos e os dúctulos eferentes parece ocorrer ao longo de todo o comprimento do testículo (VOLSOE, 1944). Em cascavéis e jararacas, também foram observadas estas características do epidídimo. O ducto do epidídimo possui um diâmetro grande apresentando um epitélio estratificado, mas sem cílios ou estereocílios, como os observados nos dúctulos epididimários. O ducto do epidídimo é contínuo com o ducto deferente e gradualmente passa para este, justamente na região posterior do testículo, como já foi observado em *Vipera berus* por Volsoe (1944) e neste trabalho.

Em cascavéis e jararacas, os epitélios dos epidídimos (ductúlos) e ductos deferentes possuem diminutas microvilosidades apicais, características deste tipo de epitélio. Nestes epitélios, também foi observada a presença de cílios longos, semelhantes a estereocílios, provavelmente com função na absorção de excesso de fluído que acompanha os espermatozóides (YOUNG; HEATH, 2000).

O ducto deferente é o principal órgão de estocagem de esperma e esta estocagem tem sido descrita em vários gêneros de serpentes colubrídeas tais como, *Natrix*, *Masticophis*, *Pituophis*, *Seminatrix*, em elapídeos, como *Micrurus* (Almeida-Santos et al., 2000), bem como em Viperídeos como: *Trimeresurus*, *Crotalus* e *Bothrops* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; ALMEIDA-SANTOS, et al., 2004; BAUMAN; METTER, 1977; GOLDBERG; JANEIRO-CINQUINI et al., 1993b). Entretanto, nenhuma descrição morfológica, histológica ou de ultraestrutura, destes ductos e sua relação com os espermatozóides foi conduzida.

A estocagem de esperma em jararacas e cascavéis, inicia-se na parte proximal do ducto deferente direcionando-se à parte distal. Os ductos deferentes, de ambas as espécies, são revestidos por epitélio secretor havendo interação com os espermatozóides estocados na luz ducto-deferencial, através da borda apical de microvilos. Nos ductos deferentes, também foram observados estereocílios, que provavelmente colaborem na absorção e transporte. Neste trabalho, observou-se que tanto jararacas quanto cascavéis estocam esperma no ducto deferente, durante todo o ano, mostrando todavia variações ao longo das estações.

A presença de esperma estocado por tanto tempo nos ductos deferentes destas espécies, sugere o requerimento de alguma forma de nutrição. As análises das células epiteliais que limitam a luz destes órgãos, revelam massas de espermatozóides com suas cabeças tocando e em alguns casos penetrando nestas células. É provável, deste modo, que

haja algum benefício nutricional, desta associação, como foi sugerido por Goldberg; Parker (1975) para as serpentes colubrídeas.

Em *C. durissus* e *B. jararaca* os ductos deferentes contém um número maior de espermatozóides, no verão e no outono. Observam-se aumentos testiculares e dos ductos deferentes, que estão relacionados à espermatogênese sazonal (verão), anual, que é assincrônica em relação à cópula (outono). Logo, a estocagem de esperma nas vias espermáticas em *Crotalus* e *Bothrops*, parece ser consequência do lapso de tempo estabelecido entre a cópula e a espermatogênese.

5.8 ESTOCAGEM DE ESPERMA NOS MACHOS

O processo de estocagem de esperma em serpentes é bem mais conhecido em fêmeas do que em machos, segundo Fox, (1956; 1977); Schuett (1992). Contudo, os estudos de Volsøe (1944), Shine (1977) e Saint-Girons (1982) mostram que este fenômeno também ocorre em machos.

Em répteis, o ducto deferente é a região de estocagem de esperma e, diferentemente dos mamíferos, o epidídimo não participa da maturação ou estocagem de esperma (JONES, 1998; SEVER et al., 2002). Em *C. durissus* e *B. jararaca* a configuração convoluta do ductos deferentes pode estar diretamente associada à concentração e à maturação do espermatozóide na luz dos ductos (FOX, 1977; TSUI; LICHT, 1974). Em *Crotalus durissus* (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004) observou-se um aumento da motilidade dos espermatozóides ao longo do ducto deferente (região proximal a distal). Nas regiões distais, foram observadas motilidade máxima, sugerindo que o ambiente interno ao longo do ducto influencie a maturação e a performance dos espermatozóides.

Diller e Wallace (1984) trabalhando com a *Crotalus viridis* de Idaho, EUA, observaram que os espermatozóides permanecem no ducto deferente durante todo o ano, incluindo o período de hibernação. Aldridge (1979, 1993; Aldridge; Duvall, 2002) descreveram o mesmo processo em várias sub-espécies desta cascavel, afirmando que a espermatogênese ocorre durante o verão e os espermatozóides são estocados nos ductos deferentes até o acasalamento. YOKOYAMA; YOSHIDA (1993), encontraram espermatozóides estocados na região posterior do vaso deferente em *Trimeresurus flavoviridis*, (Viperídeo). Em ambas as serpentes *Crotalus viridis* e *Trimeresurus flavoviridis*, o ciclo reprodutivo é pós-nupcial ou do Tipo I (aestival) – segundo, Saint-Girons (1982); Schuett (1992), sendo característico de serpentes de regiões temperadas.

Em cascavéis e jararacas, a espermatogênese inicia-se na primavera e no verão, respectivamente. Em ambas as serpentes, os espermatozóides estão presentes no ducto deferente, em grandes quantidades no outono (acasalamento) e no inverno. Entretanto, nestas estações, uma clara regressão testicular foi observada, em ambas as espécies (BELLUOMINI et al., 1966; SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2002; JANEIRO-CINQUINI et al., 1993b) e neste trabalho. Deste modo, estas espécies exibem uma grande habilidade para estocar espermatozóides nos ductos deferentes, mesmo quando não há atividade testicular bem definida (SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2002; JANEIRO-CINQUINI et al., 1993). A presença de esperma no ducto deferente durante todos os meses (apesar do período restrito de acasalamento), indica um potencial para ocorrência de cópulas em qualquer época do ano, fato este já observado por muitos estudos (JANEIRO-CINQUINI et al., 1993b; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004). Estas características apresentam semelhanças com padrões reprodutivos de outros viperídeos de região temperada, reforçando a classificação pós-nupcial (ou do Tipo I), para cascavéis e jararacas, segundo este estudo.

Entretanto, o pico da espermiogênese, para ambas as espécies, é no verão. Deste modo, o processo final de formação dos espermatozóides é influenciado pela elevação da temperatura do corpo. Aldridge (1975) reportou que a espermatogênese em *Crotalus viridis* foi iniciada em decorrência da estação quente, e não pela duração do fotoperíodo.

As cópulas em cascavéis e jararacas foram observadas predominantemente no outono, contudo elas poderiam ocorrer em qualquer época do ano, uma vez que os espermatozóides estão estocados nos ductos deferentes. Porém, os ciclos espermatogênicos dos machos são influenciados pelos hormônios sexuais (SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2002; SCHUETT et al., 2002), que por sua vez determinam a época da procura e corte das fêmeas atrativas. E a atratividade (estro) das fêmeas de viperídeos (ALDRIDGE; DUVALL, 2002) está relacionada à vitelogênese e aos altos níveis de estradiol, aqui descritos. Logo, a julgar por este padrão, as fêmeas de jararacas e cascavéis é que determinam a época do acasalamento como já fora enfatizado por Sever e Ryan (1999), e Aldridge e Duvall (2002) para outras espécies.

5.9 MODELOS REPRODUTIVOS

Tanto em cascavéis como em jararacas foi observada maior concentração de espermatozóides nos ductos deferentes, no verão e outono, em decorrência da espermiogênese intensa. Em ambas as espécies, a vitelogênese e o acasalamento são sincrônicos (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002) e coincide com o maior aumento do diâmetro dos ductos deferentes. Estes dados indicam que após a espermiogênese no verão, os machos combinam o pico de estocagem de esperma, com o período de vitelogênese (onde as fêmeas sinalizam o estro), e estão receptivas para a cópula (ALDRIDGE; DUVALL, 2002) e este trabalho. Todas estas

observações corroboram a hipótese que as fêmeas são as determinantes do período de acasalamento.

Após a cópula, as fêmeas de ambas as espécies, estocam esperma no útero durante o outono e o inverno. Assim sendo, os ciclos reprodutivos de machos e fêmeas se harmonizam, por meio da estocagem de esperma primeiramente nos ductos deferentes dos machos (final do verão e início do outono), e após a cópula no útero das fêmeas (final do outono e inverno) onde permanecem até ocorrer a fertilização na primavera.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- ◆ Os ovidutos em *B. jararaca* e *C. durissus* apresentam vários papéis funcionais como: estocagem de esperma, transporte de ovos, fertilização, manutenção do embrião (gestação e placentação) e parturição;
- ◆ *B. jararaca* e *C. durissus* apresentam uma placenta Epteliocorial, Tipo II, com especializações uterinas nas regiões mesometriais;
- ◆ A evolução da placentação, em ambas as espécies, levou a especializações como: redução na membrana da casca, permitindo a aposição do epitélio uterino com as membranas fetais, e adelgaçamento do epitélio uterino e corioalantóico, permitindo trocas materno fetais;
- ◆ Durante a prenhez foram observados a manutenção do corpo lúteo e aumento do nível de progesterona acompanhando toda a gestação;
- ◆ Em ambas as serpentes, o cordão umbilical está representado por duas artérias, uma veia e o ducto do alantóide. E uma artéria e uma veia vitelínica. Em todos os fetos, observados, o vitelo (saco do ovo) e os vasos vitelínicos, migraram, para dentro do abdômen, antes do nascimento.
- ◆ Provavelmente a retração do saco do ovo seja resultado do encurtamento do talo vitelínico, formado pela artéria e veia vitelínica, visto que em recém nascidos, observam-se apenas rudimentos deste talo vitelínico.

- ◆ O vitelo remanescente do desenvolvimento embrionário parece ser substancial (2% a 5% da massa dos filhotes) e pode representar uma reserva para a sobrevivência dos filhotes nas primeiras semanas de vida;
- ◆ A vitelogênese em ambas as espécies é sazonal (final do verão e início do outono), e é classificada como Tipo II;
- ◆ A vitelogênese é coincidente com a cópula e provavelmente as fêmeas sinalizam a sua atratividade (estro) por meio (feromônios) em função de altos níveis de estradiol;
- ◆ A espermatogênese em ambas as espécies, ocorre na primavera e verão e ambas as espécies estocam esperma nos ductos deferentes. Este ciclo é do Tipo I ou pós-nupcial;
- ◆ Os machos apresentam maior concentração de espermatozóides (espermio gênese) nos ductos deferentes na época do acasalamento (verão e outono);
- ◆ As fêmeas de *C. durissus* e *B. jararaca* estocam espermatozóides, no útero, por meio de uma mudança conformacional da musculatura uterina, no outono e o inverno;

- ◆ Fêmeas e machos, em ambas as espécies, possuem especializações nos epitélios uterinos e dos ductos deferentes que presumivelmente nutrem os espermatozóides durante a estocagem;
- ◆ Machos e fêmeas harmonizam seus ciclos por meio da estocagem de esperma. Os machos combinam seu pico de espermiogênese para a época em que as fêmeas estão atrativas e (receptivas). E fêmeas estocam espermatozóides, para o desenvolvimento embrionário e nascimentos ocorrerem na melhor época do ano (verão).

6.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Evidenciamos nesse estudo como as estratégias reprodutivas utilizadas por *C. durissus* e *B. jararaca* tanto machos quanto fêmeas comporiam um modelo reprodutivo para crotálineos vivíparos da região tropical. Discutimos também as características desse modelo, comparando-o com outros descritos para serpentes de região temperada. Os resultados aqui apresentados, para ambas as espécies mostram que a espermatogênese e a vitelogênese são sazonais e as duas espécies de serpentes, machos e fêmeas estocam espermatozóides nos seus tratos genitais. Apresentamos também como a viviparidade evoluiu para um tipo de placentação comum nas duas espécies, e como ambas as espécies evoluíram adotando estratégias reprodutivas diferenciadas sob o ponto de vista ecológico. Relatamos, ainda como essas estratégias diferenciadas podem influenciar os quadros epidemiológicos no Estado de São Paulo, Brasil

Referências

REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A. N. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. Primeira aproximação. **Geomorfologia Instituto Geográfico Universidade São Paulo**, n.2, p.1-21, 1977.
- ABDALLA, F. M. F. **Estudos de aspectos histomorfométricos e funcionais do útero da serpente *Bothrops jararaca*; análise comparativa com a rata**. 1994. 121f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, São Paulo, 1994.
- ABDALLA, F. M. F.; HAYASHI, H.; PICARELLI, Z. P.; PORTO, C. S.; ABREU, L. C. Sensitivity of the *Bothrops jararaca* snake uterus to oxytocin and acetylcholine. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 113, p. 353-358, 1996.
- ALDRIDGE, R. D. Environmental control of spermatogenesis in the rattlesnake *Crotalus viridis*. **Copeia**, p. 493-496, 1975.
- ALDRIDGE, R. D. Female reproductive cycles of the *Arizona elegans* and *Crotalus viridis*. **Herpetologica**, v. 35, p. 256-261, 1979b.
- ALDRIDGE, R. D. Male reproductive anatomy and seasonal occurrence of mating and combat behavior of the rattlesnake *Crotalus v. viridis*. **Journal of Herpetology**, v. 27, p. 481-484, 1993.
- ALDRIDGE, R. D. Oviductal anatomy and seasonal sperm storage in the south eastern crowned snake (*Tantilla coronata*). **Copeia**, p. 1103-1106, 1992.
- ALDRIDGE, R. D. Seasonal spermatogenesis in sympatric *Crotalus viridis* and *Arizona elegans* in New Mexico. **Journal of Herpetology**, v. 13, p. 187-192, 1979a.
- ALDRIDGE, R. D. The link between mating season and male reproductive anatomy in the rattlesnakes *Crotalus viridis oreganus* and *Crotalus viridis helleri*. **Journal of Herpetology**, v. 36, p. 295-300, 2002.
- ALDRIDGE, R. D.; DUVALL, D. Evolution of the mating season in the pitvipers of North America. **Herpetological Monographs**, v. 16, p. 1-25, 2002.

- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ABDALLA, F. M. F.; SILVEIRA, P. F.; YAMANOUYE, N.; BRENO, M. C.; SALOMÃO, M. G. Reproductive cycle of the neotropical *Crotalus durissus terrificus*: I. Seasonal levels and interplay between steroid hormones and vasotocinase. **General Comparative Endocrinology**, v. 139, p. 169 -174, 2004.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ALBOLEA, A. B. P.; SALOMÃO, M. G. Acidentes botrópicos e crotálicos no Estado de São Paulo: uma visão ecológica. In: MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN, 59., 2002, São Paulo. **Anais...**, São Paulo: RCIB, 2002. p. 185.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ANTONIAZZI, M. M.; SANTANA, O. S.; JARED, C. Predation by the opossum *Didelphis marsupialis* on the rattlesnake *Crotalus durissus*. **Currenty Herpetology**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2000.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; GERMANO, V. J. *Crotalus durissus* Prey. **Herpetological Review**, v. 27, n. 3, p. 143, 1996.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; LAPORTA-FERREIRA, I. L.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C. Sperm storage in males of the snake *Crotalus durissus terrificus* (Crotalinae: Viperidae) in southeastern Brazil. **Comparative Biochemistry and Pyisiology**, v.139, p. 169-174, 2004.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; LAPORTA-FERREIRA, I. L.; PUORTO, G. Ritual de combate em *Crotalus durissus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 62, p. 418, 1990.
- 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, p. 109-112, 2002.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ORSI, A. M.; MIGLINO, M. A. Chorioallantoic placenta in the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes-Viperidae). **Placenta**, v. 24, p. 36, 2003.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; PRADO, L.; MARQUES, O. A. V. Eventos sincrônicos na reprodução da “cobra coral” *Micrurus corallinus* (Elapidae) do Sudeste do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 23., 2000, Mato Grosso. **Anais...**, Mato Grosso: CBZ, 2000. p. 245.

ALMEIDA-SANTOS, S.M.; SALOMÃO, M.G. Long-term sperm storage in the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). **Japanese Journal Herpetology**, v. 17, p. 46-52, 1997.

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

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Reproductive senescence of the Neotropical Rattlesnake *Crotalus durissus cascavella* (Serpentes: Viperidae). **Bulletin of Chicago Herpetology Society**, v. 34, n. 11, p. 250, 1999.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G.; PENETI, E. A.; SENA, P. S.; GUIMARÃES, E. S. Predatory combat and tail wrestling in hierarchical contests of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes:Viperidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 20, p. 88-96, 1999.

ANDRÉN, C.; NILSON, G. The copulatory plug of the adder, *Vipera berus*: a reply. **Oikos**, v. 49, p. 232-233, 1987.

BAUCHOT, R. La placentation chez les reptiles. **Annales Biologiques**, v. 4, p. 547-575, 1965.

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

BELLAIRS, A. D. A.; UNDERWOOD, G. The origin of snakes. **Biological Review Cambridge Philosophical Society**, v. 26, p. 193-237, 1951.

BELLAIRS, R.; GRIFFITHS, I.; BELLAIRS, A. D. A. Placentation in the adder, *Vipera berus*. **Nature**, v. 176, p. 657- 659, 1955.

BELLUOMINI, H. E.; FRANCO DE MELLO, E.; PENHA, A. M.; SCHREIBER, G. Estudo citológico e ponderal do testículo de *Crotalus durissus terrificus* durante o ciclo reprodutivo anual. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 33, p. 761-766, 1966.

BIASI, P. Estudo sobre mecanismo de transmissão transplacentária “in vivo” de Hepatozoon Miller, 1908 em serpentes vivíparas Crotalinae (*Crotalus* Linnaeus, 1758 e *Bothrops* Wagler, 1824) e algumas observações nomenclaturais sobre os hospedeiros e

parasitas. 1986. 168 f. Tese (Doutorado) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1986.

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 Linnean Society**, v. 50, p. 295-311, 1993.

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

BLACKBURN, D. G. Discrepant usage of term “ovoviviparity” in the herpetological literature. **Herpetological Journal**, v. 4, p. 65-72, 1994.]

BLACKBURN, D. G. Evolutionary origins of viviparity in the Reptilia. I. Sauria. **Amphibia-Reptilia**, v. 3, p. 185-205, 1982.

BLACKBURN, D. G. Evolutionary origins of viviparity in the Reptilia. I.I. Serpentes, Amphisbaenia, and Ichthyosauria. **Amphibia-Reptilia**, v. 5, p. 259-291, 1985.

BLACKBURN, D. G. Histology of the late-stage placental of the matrotrophic skin *Chalcides chalcides* (Lacertidae: Scincidae). **Journal of Morphology**, v. 216, p. 179-195, 1993b.

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

BLACKBURN, D. G. Saltationist and punctuated equilibrium models for the evolution of viviparity and placentation. **Journal of Theoretical Biology**, v.174, p. 199-216, 1995.

BLACKBURN, D. G. Structure function and evolution of the oviducts of squamate reptiles, with special, reference to viviparity and placentation. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 282, p. 560-617, 1998.

BLACKBURN, D. G.; EVANS, H. E.; VITT, L. J. The evolution of fetal nutritional adaptations. **Fortschritte der Zoologie**, v. 30, p. 437-439, 1985.

BLACKBURN, D. G.; VITT, L. J. Reproduction in South American lizards of the genus *Mabuya*. In: HAMLETT, W., **Reproductive Biology of South American Vertebrates: Aquatic and Terrestrial**. New York: Springer-Verlag, 1992, p. 150-164.

- BLACKBURN, D. G.; VITT, L. J. Specializations of the chorioallantoic placenta in the Brazilian scincid lizard, *Mabuya heathi*: a new placental morphotype for reptiles. **Journal of Morphology**, v. 254, p. 121-131, 2002.
- BLACKBURN, D.G.; VITT, L.J.; BEAUCHAT, C.A. Eutherian-like reproductive specializations in a viviparous reptiles. **Proceedings National Academic Science**, v. 81, p. 4869-4863, 1984.
- BLEM, C. R. Biennial reproduction in snakes: an alternative hypothesis. **Copeia**, p.961-963, 1982.
- BONNET, X.; NAULLEAU, G.; BRADSHAW, D.; SHINE, R. Changes in plasma progesterone in relation to vitellogenesis and gestation in the viviparous snake *Vipera aspis*. **General Comparative Endocrinology**, v. 121, p. 84-94, 2001.
- BONNET, X.; NAULLEAU, G.; MAUGET, R. The influence of body condition on 17 β estradiol levels in relation to vitellogenesis in female *Vipera aspis* (Reptilia, Viperidae). **General Comparative Endocrinology**, v. 93, p. 424-437, 1994.
- BROWN, W. S. Female reproductive ecology in a northern population of the timber rattlesnake, *Crotalus horridus*. **Herpetologica**, v. 47, p. 101-115, 1991.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. Taxonomic status of miscellaneous neotropical viperids, with the description of a new genus. **Occasional papers of the Museum of Texas University**. v. 153, p. 1-31, 1992.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. Comstock, Ithaca, New York:1989. 425 p.
- CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. New York: Cornell University Press, 2004. 728 p.
- CARROL, R. L. The origin of lizards. In: ANDREWS, S.; MILES, R.; WALKER, A. (eds.). **Problems in vertebrate evolution**. London: Academic Press Inc, 1977. p. 359-96.
- CARSON, H. L. Delayed fertilization in a captive indigo snake with notes on feeding and shedding. **Copeia**, p. 222-225, 1945.

CREWS, D.; GARSTKA, W. R. The ecological physiology of a garter snake. **Scientific American**, v. 247, p. 158-168, 1982.

CUELLAR, O. Egg transport in lizards. **Journal of Morphology**, v. 130, p. 129-136, 1970.

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

DERICKSON, W. K. Lipid storage and utilization in reptiles. **American Zoologist**, v. 16, p. 711- 723, 1976.

DESSAUER, H. C. Blonde chemistry of reptiles: physiological and evolutionary aspects. In: GANS, C.; PARSONS, T. S. (Eds.). **Biology of the reptilian**, New York: Academic Press, 1970, v. 3, 1-72 p.

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

DILLER, L. V.; WALLACE, R. L. Reproductive biology of the northern pacific rattlesnake (*Crotalus viridis oreganus*) in northern Idaho. **Herpetologica**, v. 40, p. 182-193, 1984.

ESTES, R.; QUEIROZ, K.; GAUTHIER, J. Phylogenetic relationships within Squamata. In: ESTES, R.; PREGIL, G. (Eds.). **Phylogenetics relationships of the lizard families**. California: Standford University Press, 1988. p. 119-281.

FITCH, H.S. Autecology of the copperhead. **University Kansas Publication Museum. Natural History**, v.13, p. 85-288, 1960.

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

FOX, W. The urogenital system of reptiles. In: GANS, C.; PARSONS, T. S. (Eds.). **Biology of the reptiles**, New York: Acad. Press, 1977, p. 1-157.

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

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

FRAENKEL, L.; MARTINS, T. Estudos sobre a fisiologia sexual das serpentes. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 13, p. 393-398, 1939.

FRAIPONT, M.; CLOBERT, J.; BARBAULT, R. The evolution of oviparity with egg guarding and viviparity in lizards and snakes: a phylogenetic analysis. **Evolution**, v. 50, n. 1, p. 391-400, 1996.

FRANCO, F. L. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.W.; MÁLAQUE, C.M.S.; VIDAL, JR., H. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. 468 p.

GAUTHIER, J.; ESTES, R.; QUEIROZ, K. A Phylogenetic analysis of Lepidosauriormorpha. In: ESTES, R.; PREGIL, G. (eds.). **Phyogenetics relationships of the lizard families**. California: Standford University Press, 1988. p. 15-98.

GHELMAN, R. **Estudo morfológico ontogenético das vias genitais femininas de cascavel, *Crotalus durissus terrificus*, (Laurenti, 1768) (Squamata, Viperidae)**. 1998. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

GIACOMINI, E. Matériaux pour l'étude du developpement du *Seps chalcidis*. **Archives italiennes de Biologie**, v. 16, p. 332-359, 1891.

GIBBONS, J. W. Reproduction, growth, and sexual dimorphism in the canebrake rattlesnake (*Crotalus horridus atricaudatus*). **Copeia**, p. 222-226, 1972.

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.; JONES, J. M. Sperm storage within the oviduct of turtles. **Journal of Morphology**, v. 199, p. 379-384, 1989.

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

GOLDBERG, S. R. Reproduction in the twin-spotted rattlesnake, *Crotalus pricei* (Serpentes: Viperidae). **Western North American Naturalist**, v. 60, n. 1, p. 98-100, 2000.

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.

GOMES, N.; PUORTO, G. Atlas Anatômico de *Bothrops jararaca* Wied, 1824 (Serpentes: Viperidae). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 55 n. 1, p. 69-100, 1993.

GREENE, H. W. **Snakes. The evolution of mystery in nature**. Berkeley: University of California Press, 1997. 351 p.

GROSS, M. R.; SHINE, R. Parental care and mode of utilization in ectothermic vertebrates. **Evolution**, v. 35, p. 775-793, 1981.

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

GUIBÉ, J. L'appareil uro-genital. La reproduction. In: GRASSÉ, P. P. (ed.). **Traité de zoologie, reptiles**, v. 14, p. 810-828, 1970.

GUILLETTE, JR., L. J. The evolution of viviparity and placentation in the high-altitude, Mexican lizard *Sceloporus aeneus*. **Herpetologica**, v. 38, p. 94-103, 1982.

GUILLETTE, JR., L. J. The evolution of viviparity in lizards. **Bioscience**, v. 43, p. 742-751, 1993.

GUILLETTE, JR., L.J.; JONES, R. E. Ovarian, oviductal, and placental morphology of the reproductively bimodal lizard, *Sceloporus aeneus*. **Journal of Morphology**, v. 184, p. 85-98, 1985.

GUILLETTE, JR., L. J.; JONES, R. E.; FITZGERALD, K. T.; SMITH, H. M. Evolution of viviparity in the lizard genus *Sceloporus*. **Herpetologica**, v. 36, p. 201-215, 1980.

HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in farm animals**. 6. ed. Philadelphia: Lea, 1993. p. 573.

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. 149-159, 1982.

HARRISON, L.; WEEKES, H. C. On the occurrence of placentation in the scincid lizard, *Lygosoma entrecasteauxi*. **Proceedings of the Linnaean Society**, v. 50, p. 470-486, 1925.

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.

HILDEBRAND, M. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 3. ed. 1995. 60 p.

HOFFMAN, L. H. Placentation in the garter snake, *Thamnophis sirtalis*. **Journal of Morphology**, v. 131, p. 57-88, 1970.

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

ISOGAWA, K; KATO, M. mating season of the japanese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* (Viperidae: Crotalinae), in Southern Kyushu, Japan: relations with female ovarian development. **Japanese Journal Herpetology**, v.16, n. 2, p. 42-48, 1995.

JACOB, J. S.; WILLIAMS, S. R.; REYNOLDS, R. P. Reproductive activity of male *Crotalus atrox* and *Crotalus scutulatus* (Reptilia:Viperidae) in Northeastern Chihuahua, México. **Southwest Nature**, v. 32, p. 273-276, 1987.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F.; FARIAS, E. C.; LEINZ, F. F. Relation between the quantity of abdominal fat and the reproductive state of the snake *Bothrops jararaca*. **The Snake**, v. 27, p. 21-24, 1995.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F.; LEINZ, F. F.; FARIAS, E. C. Seasonal variation in weight and length of the testicles and the quantity of abdominal fat of the snake *Bothrops jararaca*. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 55, p. 15-19, 1993b.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F.; LEINZ, F. F.; FARIAS, E. C. Ovarian cycle of the snake *Bothrops jararaca*. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 55, p. 33-36, 1993a.

JOHNSON, L. F.; JACOB, J. S.; TORRANCE, P. Annual testicular and androgenic cycles of the cottonmouth (*Agkistrodon piscivorus*) in Alabama. **Herpetologica** v. 38, p. 16-25, 1982.

JONES, R. C. Evolution of the vertebrate epididymis. **Journal of Reproduction Fertilization**, v. 53, p. 163-181, 1998.

KING, R. B. Determinants of offspring number and size in the brown snake, *Storeria dekayi*. **Journal of Herpetology**, v. 27, p. 175-185, 1993.

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

LANGLADA, F. G. Ciclo sexual bienal de serpentes *Crotalus* do Brasil - comprovação. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 26, p. 67-72, 1972.

LANGLADA, F. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; LAPORTA-FERREIRA, I. L. Techniques of Artificial Insemination in *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae-Crotalinae). **Brazilian Journal Veterinary Research Animals Science**. v.31, p. 141-144, 1994.

LÉCURU-RENOUS, S.; PLATEL, R. La vipere aspic *Vipera aspis* L. Paris: Doin-Deren, **Travaux Pratiques de Biologie Animale**, p. 1- 53, 1970.

LEE, M. S. Y.; CALDWELL, M.W. Anatomy and relationships of *Pachyhachis problematicus*, a primitive snakes with hindlimbs. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 352, p. 1521- 1552, 1998.

LEE, M. S. Y.; SCANLON, J. D. Snake phylogeny based on osteology, soft anatomy and ecology. **Biological Review**, v. 77, p. 333-401, 2002.

LUCKETT, W. P. Ontogeny of amniote fetal membranes and their application to phylogeny. In: HECHT, M. K.; GOODY, P. C.; HECHT, B. M. (Eds.). **Major Patterns in Vertebrate Evolution**. New York: Plenum Press, 1977, p. 439-516.

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

MACARTNEY, J. M.; GREGORY, P. T. Reproductive biology of female rattlesnakes (*Crotalus viridis*) in British Columbia. **Copeia**, p. 47-57, 1988.

MAGNUSSON, W. E. Production of an embryo by an *Acrochordus javanicus* isolated for seven years. **Copeia**, p. 744-745, 1979.

MARQUES, O. A. V.; ETEROVIC, A.; SAZIMA, I. **Serpentes da Mata Atlântica: guia ilustrado para a Serra do Mar**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 184 p.

MARQUES, O. A. V. Biologia reprodutiva da cobra-coral *Erythrolamprus aesculapii* (Colubridae), no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.13, n. 3, p. 747-753, 1996.

MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. História natural das serpentes. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.W.; MÁLAQUE, C.M.S.; VIDAL, JR., H. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 62-71.

MARTIN, W. H. Phenology of the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) in an unglaciated section of the Appalachian mountains. In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE, J.R., E. D. (Eds.). **Biology of the pitvipers**. Texas: Selva, 1992 p. 259-277.

MASSON, G. R.; GUILLETE, L. J.; Changes in oviductal vascularity during the reproductive cycle of three oviparous lizards (*Eumeces obsoletus*, *Sceloporus undulatus* and *Crotaphytus collaris*). **Journal Reproduction Fertilization**, v. 80, p.361-371, 1987.

McDOWELL, S. Systematics. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S. (Eds.). **Snakes: ecology and evolutionary biology**. New York: Macmillian Publishing Co., 1987. p. 3-50.

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

MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.W.; MÁLAQUE, C.M.S.; VIDAL, JR., H. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.p. 33-61.

MOSSMAN, H. W. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. **Carnegie of Institute Contributions Embryology**, v. 26, p. 129-246, 1937.

MOSSMAN, H. W. **Vertebrate fetal membranes**. New Brunswick: Rutgers Univ. Press, 1987. 383 p.

NAULLEAU, G.; BONNET, X. Body condition threshold for breeding in a viviparous snake. **Oecologia**, v. 107, p. 301-306, 1996.

NAULLEAU, G.; BONNET, X.; VACHER-VALLAS, M.; SHINE, R.; LOURDAIS, O. Does less-than-annual production of offspring by female vipers (*Vipera aspis*) mean less-than-annual mating? **Journal of Herpetology**, v. 33, p. 668-691, 1999.

NAULLEAU, G.; FLEURY, F. Changes in plasma progesterone in females *Vipera aspis* L. (Reptilia, Viperidae) during the sexual cycle in pregnant and nonpregnant females. **General Comparative Endocrinology**, v. 78, p. 433-443, 1990.

OLIVEIRA, L.; SCARTOZZONI, R. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Como filhotes de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) e jararaca (*B. jararaca*) se nutrem após o nascimento? In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 25., 2004, Brasília. **Anais...**, Brasília: CBZ, 2004. p. 397.

ORSI, A. M. Estrutura comparativa e histofisiologia da via espermática. **Brazilian Journal Morfology Science**, v. 16, p. 109-112, 2000.

PACKARD, G. C.; TRACY, C. R.; ROTH, J. J. The physiological ecology of reptilian eggs and embryos, and the evolution of viviparity within the class reptilia. **Biology Review**, v. 52, p. 71-105, 1977.

PALMER B. D.; GUILLETTE, L. G. Histology and functional morphology of the female reproductive tract of the tortoise *Gopherus polyphemus*. **American Journal Anatomic**, v. 183, p. 200-211, 1988.

PANIGEL, M. Etude anatomohistologique des corps atrétiques pendant la gestation, chez le lézard ovovivipare *Zootoca vivipara* W. (*Laceta vivipara* J.). **Bullettin Society Zoology França**, v. 66, p. 75-78, 1951.

PARKER, W.; PLUMMER, M. Population Ecology. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S. (Eds.). **Snakes: ecology and evolutionary biology**. New York: MacMillan, 1987. 253-301 p.

PORTO, A. Sobre a presença de progesterona nos corpos amarelos das serpentes ovovivíparas. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 15, p. 27-30, 1941.

POUGH, F. H.; ANDREWS, R. M.; CADLE, J. E.; CRUMP, M. L.; SAVITSKY, A. H.; WELLS, K. D. **Herpetology**. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1998. 577 p.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 3ed. São Paulo: Atheneu, 3. ed. 2003. 560 p.

QUALLS, C. P.; ANDREWS, R. M.; MATHIES, T. The evolution of viviparity and placentation revisited. **Journal of Theoretical Biology**, v. 85, p. 129-135, 1997.

RAGE, J.C. Fossil History. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S. (eds.). **Snakes: ecology and evolutionary biology**. New York: Macmillian Publishing Co., 1987. p. 51-76.

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

RIEPPPEL, O. The classification of the Squamata. In: BENTON, M. (ed.). **The phylogeny and classification of tetrapods**. Oxford: Clarendon Press, 1988. 119-281 p.

RIEPPPEL, O.; ZAHER, H. The braincase of mosasaurs and Varanus, and the relationships of snakes. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 129, p. 489-514, 2000.

ROMER, A. S.; PARSONS, T. S. **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 1985. p. 345-350.

SAINT- GIRON, H. Sperm survival and transport in the female genital tract of reptiles. In: HAFEZ, E. S. E.; THIBAUT, C. G. (Eds.). **The Biology of Spermatozoa**. Switzerland, S. Karger: Basel, 1975, p. 106-113.

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

SALOMÃO, M. G.; WÜSTER, W.; THORPE, R. S. DNA evolution of South American pit vipers of the genus *Bothrops*. In: THORPE, R. S.; WÜSTER, W.; MALHOTRA, A. (eds.). **Venomous snakes: ecology, evolution and snakebite**. Oxford: Clarendon Press, 1997. p. 89-98.

SALOMÃO, M. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. The Reproductive cycle in male neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). In: SCHUETT, G.W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. (eds.). **Biology of the vipers**, Carmel, Indiana: Eagle Mountain, 2002. p. 507-514.

SALOMÃO, M. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; PUORTO, G. Activity pattern of the rattlesnake *Crotalus durissus* (Viperidae: Crotalinae): Feeding, reproduction and snakebite. **Studies on Neotropical Fauna Environment**, v. 30, p. 101-106, 1995.

SANT'ANNA, S. S. **Hábito alimentar da cascavel *Crotalus durissus* no Sudeste Brasileiro (Serpentes, Viperidae)**. 1999. 64 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1999.

SAZIMA, I. Estudo da biologia comportamental da jararaca, *Bothrops jararaca*, com uso de marcas naturais. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 50, p. 83-89, 1988.

SAZIMA, I. Natural history of the jararaca pitvipser *Bothrops jararaca* in southeastern Brazil. In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE, JR., E. D. (Eds.). **Biology of the pitvipers**. Texas: Selva, 1992 p. 199-216.

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

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. (Eds.). **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. (Eds.). **Snakes: ecology and evolutionary biology**. New York: MacMillan, 1987. p. 210-252.

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

SEVER, D. M., RYAN, T. J. Ultrastructure of the reproductive cycle of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). Part I. Evidence for oviducal sperm storage. **Journal Morphology**, v. 238, p. 143-155, 1999.

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.

SHINE, R. "Costs" of reproduction in reptiles. **Oecologia**, v. 46, p. 92-100, 1980.

SHINE, R. Ecology of a low-energy specialist: food habits and reproductive biology of the Arafura Filesnake (Acrochordidae). **Copeia**, p. 424 – 437, 1986.

SHINE, R. Reproduction in Australian elapid snakes I – Testicular cycles and matting seasons. **Australian Journal Zoology**, v. 25, p. 647-53, 1977.

SHINE, R. Reptilian viviparity in cold climates: testing the assumptions of an evolutionary hypothesis. **Oecologia**, v. 57, p. 397-405, 1983.

SHINE, R. Sexual size dimorphism in snakes revisited. **Copeia**, v. 2, p. 326 – 346, 1994.

SHINE, R. The evolution of viviparity in reptiles: an ecological analysis. In: GANS, C.; BILLET, F. (Eds.). **Biology of the reptilia**, New York: John Willey, 1985. p. 605-694.

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

SHINE, R.; GUILLETTE, L. J. The evolution of viviparity in reptiles: a physiological model and its ecological consequences. **Journal of Theoretical Biology**, v. 132, p. 43-50, 1988.

SHIROMA, H. Follicular growth and fat body cycle of female habus, *Trimeresurus flavoviridis*, in the Okinawa Islands. **Japanese Journal Herpetology**, v. 15, p. 53-58, 1993.

STEARNS, S. C. **The evolution of life histories**. New York: Oxford University Press, 1992. p. 248.

STEWART, J. R. Facultative placentotrophy and the evolution of squamate placentation: quality of eggs and neonates in *Virginia striatula*. **American Naturalist**, v. 133, p. 111-137, 1989.

STEWART, J. R. Morphology and evolution of the egg of oviparous amniotes. In: SUMIDA, S. S.; MARTIN, K. L. M. (Eds.). **Amniote Origins**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 291-326.

STEWART, J. R. Placentation in the lizard *Gerrhonotus coeruleus* with a comparison to the extraembryonic membranes of the oviparous *Gerrhonotus multicarinatus* (Sauria, Anguidae). **Journal of Morphology**, v. 185, p. 101-114, 1985.

STEWART, J. R. Yolk sac placentation in reptiles: structural innovation in a fundamental vertebrate fetal nutritional system. **Journal of Experimental Zoology**, v. 266, p. 414-449, 1993.

STEWART, J. R.; BLACKBURN, D.G. Reptilian placentation: structural diversity and terminology. **Copeia**, p.839-852, 1988.

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

STEWART, J. R.; THOMPSON, M. B. Placental structure of the Australian lizard, *Niveoscincus metallicus* (Squamata: Scincidae). **Journal of Morphology**, v. 227, p. 223-236, 1994.

SHINE, R. The evolution of viviparity: ecological correlates of reproductive mode within a genus of Australian snakes (*Pseudechis*: Elapidae). **Copeia**, p. 551-563, 1987.

SUN, L. X.; SHINE, R.; ZHAO, D. B.; TANG, Z. R. Low costs, high output: reproduction in an insular pit-viper (*Gloydius shedaoensis*, Viperidae) from north-eastern China. **Journal Zoologist London**, v. 256, p. 511-521, 2002.

THOMPSON, M. B.; STEWART, J. R. Egg and clutch size of the viviparous Australian skink, *Pseudemoia pagenstecheri* and the identity of species with Type III allantopectentae. **Journal of Herpetology**, v. 28, p. 519-521, 1994.

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

TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R. **Estratégias reprodutivas de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae)**. 2001. 89 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

TSUI, H. W.; LICHT, P. Pituitary independence of sperm storage in male snakes. **General Comparative Endocrinology**, v. 22, p. 277-279, 1974.

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

UNDERWOOD, G. **A contribution to the classification of snakes**. London: Trustees of the British Museum, 1967, 167 p.

VALLE, J. R.; VALLE, L. A. R. Gonadal hormones in snakes. **Science**, v. 97, p. 400, 1943.

VANZOLINI, P. E.; HEYER, R. W. The American herpetofauna and a Interchange. In: F. G; STEHLI; WEBB, S.D. (Eds.). **The great American biotic interchange**, New York: Plenum Press, 1985, p. 475-487.

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

WAKE, M. H. Oviduct structure and function in non-mammalian vertebrates. **Fortschritte der Zoologie**, v. 30, p. 427-435, 1985.

WEEKES, H. C. A review of placentation among reptiles, with particular regard to the function and evolution of the placenta. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 2, p. 625-645, 1935.

WEEKES, H. C. On placentation in reptiles, I. **Proceedings of the Linnaean Society of New York**, v. 54, p. 34-60, 1929.

WEEKES, H. C. On placentation in reptiles. II. **Proceedings of the Linnaean Society of New York**, v. 55, p.550-576, 1930.

WEEKES, H. C. Placentation and other phenomena in the scincid lizard *Lygosoma (hinulia) quoyi*. **Proceedings of the Linnaean Society of New York**, v. 52, p. 499-554, 1927.

WOODDING, F. B.; FLINT, A. P. F. Placentation In: LAMMING, G. E. **Marshall's physiology of reproductive**. 4. ed. London: Chapman e Hall, 1994. pt.1, 186 p.

WOURMS, J. P. Viviparity: the maternal-fetal relationship in fishes. **American Zoology**, v. 21, p. 473-515, 1981.

WÜSTER, W.; SALOMÃO, M. G.; QUIJADA-MASCAREÑAS, A .J.; 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. (Eds.). **Biology of the vipers**, Carmel Indiana: Eagle Mountain, p. 111-126, 2002.

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 Comparative Endocrinology**, v. 139, p. 151-157, 2004.

YARON, Z. Reptilian placentation and gestation: structure, function, and endocrine control. In: GANS, C.; BILLET, F. (Eds.). **Biology of the reptilia**, New York: Wiley, 1985, p. 529-694.

YARON, Z.; WIDZER, L. The control of vitellogenesis by ovarian hormones in the lizard *Xantusia vigilis*. **Comparative Biochemistry and Pyisiology**, v.60, p. 279-284, 1978.

YOKOYAMA, F.; YOSHIDA, H. The reproductive cycle of the female habu, *Trimeresurus flavoviridis*. **Journal of Herpetology**, v. 28, p. 54-59, 1994.

YOKOYAMA, F.; YOSHIDA, H. The reproductive cycle of the male Habu, *Trimeresurus flavoviridis*. **The Snake**, v. 25, p. 55-62, 1993.

YOUNG, B.; HEATH, J.W. **Wheater Histologia Funcional**. Texto e Atlas em cores. 4. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2001. p. 415.

ZAHER, H. The phylogenetic position of *Pachyhachis* within snakes (Squamata, Lepidosauria). **Journal Vertebrate Paleontology**, v. 18, p. 1-3, 1998.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, 1984, p. 718.

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

ZUG, G. R. **Herpetology, an Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**, San Diego, CA: Academic Press, 1993. 527 p.