PATRÍCIA DA SILVA MARINHO

Influência do ciclo reprodutivo na biologia termal de *Crotalus durissus* neotropical (Serpentes, Viperidae) em cativeiro

Foto: Felipe Riente

São Paulo

2017

PATRÍCIA DA SILVA MARINHO

Influência do ciclo reprodutivo na biologia termal de *Crotalus durissus* neotropical (Serpentes, Viperidae) em cativeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos animais domésticos e silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos animais domésticos e silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Selma Maria Almeida Santos

São Paulo

2017

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3547
FMVZ

Marinho, Patrícia da Silva

Influência do ciclo reprodutivo na biologia termal de *Crotalus durissus* neotropical (Serpentes, Viperidae) em cativeiro. / Patrícia da Silva Marinho. -- 2017.

46 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2017.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Selma Maria Almeida Santos.

1. Termorregulação. 2. Reprodução. 3. Ciclo reprodutivo. 4. *Crotalus durissus*. 5. Temperatura corpórea. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Influência do ciclo reprodutivo na biologia termal de *Crotalus durissus* Neotropical (Serpentes, Viperidae) em cativeiro", protocolada sob o CEUA nº 4339200715, sob a responsabilidade de **Selma Maria de Almeida Santos e equipe; Patricia da Silva Marinho; Diego Muniz Ferreira Silva; Kalena Barros da Silva; Viviane Garcia** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/08/2016.

We certify that the proposal "Influence of the reproductive cycle on the thermal biology of *Crotalus durissus* Neotropical (Serpentes, Viperidae) in captivity", utilizing 42 Reptiles (6 males and 36 females), protocol number CEUA 4339200715, under the responsibility of **Selma Maria de Almeida Santos and team; Patricia da Silva Marinho; Diego Muniz Ferreira Silva; Kalena Barros da Silva; Viviane Garcia** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/15/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2015** a **08/2017**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Répteis**

sexo: **Fêmeas**

idade: **1 a 20 anos**

N: **36**

Linhagem: **serpentes**

Peso: **600 a 1 kg**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Répteis**

sexo: **Machos**

idade: **1 a 20 anos**

N: **6**

Linhagem: **serpentes**

Peso: **600 a 1 kg**

Resumo: Todos os processos fisiológicos em animais ectotérmicos são dependentes da temperatura, ou seja, todos os processos da vida incluindo, desenvolvimento, crescimento e reprodução refletem o efeito da temperatura corpórea de um indivíduo. Em répteis, é evidente que o processo mais afetado é o comportamento, o que pode influenciar diretamente no desempenho de processos que determinam a sua sobrevivência e, conseqüentemente, seu fitness, isto é, o tamanho da prole para garantir o sucesso para a próxima geração.

Em serpentes, diversas atividades são afetadas diferentemente por variações da temperatura corpórea de forma que, o desempenho em cada atividade em particular (e.g., locomoção, digestão, reprodução) pode ser otimizado em diferentes temperaturas.

Com base em registros da literatura, a reprodução de répteis Squamata é fortemente relacionada a variação da temperatura corpórea do indivíduo. Diversas espécies de serpentes alteram sazonalmente a temperatura corpórea nos períodos reprodutivos. Por exemplo, várias espécies de serpentes e lagartos, elevam a temperatura corpórea e reduzem a variação no período de gestação. O significado adaptativo deste aumento na temperatura estaria ligado a aceleração do desenvolvimento embrionário e, conseqüentemente a redução do período gestacional. Outro processo que parece corresponder positivamente com as condições termais é a espermatogênese, visto que, algumas espécies de serpentes produzem espermatozoides em temperaturas ambientais mais adequadas. Porém, não se sabe ao certo as relações de temperatura corpórea e a produção de espermatozoides, bem como, a qualidade do mesmo diante das variações térmicas.

A espécie *Crotalus durissus* neotropical é fortemente estudada sob o contexto ecológico, história natural e atualmente sobre os aspectos das estratégias reprodutivas. Tem o ciclo reprodutivo bem definido como sazonal. Fêmeas de *Crotalus durissus* reproduzem por viviparidade. A vitelogênese (deposição de vitelo nos folículos ovarianos) inicia-se no final do verão. A cópula ocorre no outono, estação em que os machos engajam-se na procura pelas fêmeas. A estocagem de espermatozoide nas fêmeas se estende durante o inverno, por meio da contorção muscular uterina (UMT- Almeida-Santos & Salomão, 2002). A vitelogênese finaliza na primavera, quando ocorre a ovulação e conseqüente a fertilização. O desenvolvimento embrionário e parturição limitam-se ao verão, estação em que ocorre o pico de espermatogênese dos machos. Sendo assim, *Crotalus durissus* apresenta-se como um modelo potencial para estudos a cerca da biologia termal, e como os fatores da temperatura corpórea e o comportamento

termorregulatório determinam o sucesso reprodutivo.

Estudos sobre termorregulação com serpentes neotropicais, ainda são escassos. Bovo (2009) realizou um estudo sobre Ecologia termal da jararaca-ilhoa, *Bothrops insularis* em condições naturais, nos fornecendo informações relevantes a respeito do perfil térmico de um viperídeo neotropical, fornecendo parâmetros para o entendimento das relações térmicas e outros aspectos da biologia de serpentes. Considerando que o ciclo desta espécie (*B. insularis*) seja sazonal e as estratégias reprodutivas sejam semelhantes às da espécie *Bothrops jararaca* do continente, que juntamente com *Crotalus durissus*, compartilham do padrão reprodutivo similar, podemos extrapolar tais informações para *C. durissus* com intuito de expandir o conhecimento e compreender a relevância da biologia termal no sucesso reprodutivo de serpentes.

Local do experimento: Os experimentos serão realizados totalmente no serpentário do Instituto Butantan, exceto a coleta de sêmen. Os machos serão levados para o biotério do Leev nos períodos de coleta de sêmen, após os procedimentos, serão novamente colocados no serpentário para continuidade na coleta dos dados

São Paulo, 05 de julho de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MARINHO, Patrícia Silva

Título: **Influência do ciclo reprodutivo na biologia reprodutiva de *Crotalus durissus* neotropical (Serpentes, Viperidae) em cativeiro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos animais domésticos e silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Marilene e Francisco por toda luta, dedicação e empenho
nessa minha trajetória. E aos meus irmãos Letícia, Joíce e Bruno, por
todo amor, apoio e torcida pela realização dos meus sonhos...*

AGRADECIMENTOS

É com imensa satisfação e gratidão que escrevo esta seção (até rimou hehehe)

Agradeço primeiramente a **DEUS**, por colocar sonhos em minha vida e preparar o caminho para que eu possa seguir e buscar minhas realizações. Obrigada por colocar em meu caminho pessoas de bem, que me ajudam, apoiam, incentivam e torcem por mim sempre!

Agradeço a minha **família**, por todo amor, união e companheirismo. AMOR MAIOR DO MUNDO.

Obrigada **Selma**! Por abrir as portas pra mim, por realizar meu sonho de infância - entrar no serpentário de jaleco branco e conhecer e cuidar desses animais incríveis que são as serpentes.

Obrigada **Letícia Sueiro**! Pela co-orientação no início deste projeto, pelos ensinamentos, ideias, paciência. Obrigada por me encorajar em fazer algo novo.

Obrigada **Adriano Fellone**! Por toda ajuda e apoio desde o início, por acreditar em mim, pelos conselhos e ensinamentos, por toda disposição e dedicação em me ajudar em qualquer momento. E principalmente, muito obrigada por ser meu psicólogoahaha, amigo e o melhor profissional que já conheci.

Obrigada **Natalia Torello**! Pela amizade, pelas várias ajudas e ficadas até altas horas da noite no laboratório me ajudando no desenvolvimento do trabalho. Obrigada por ensinar os cuidados e manejo com as serpentes, pelas palhaçadas, risadas e pipoca com toddy batido.

Obrigada **Karina Banci**! Por todas as traduções e correções de resumos, artigos etc. Obrigada por essa amizade sensacional, pelo carinho e por ser essa pessoa incrível.

Obrigada a todos da **Fundap** que me deram uma força gigantesca ao longo deste trabalho. **Hugo, Evandro, Jaqueline, Henri, Thiago, Priscila, Maísa, Ivan, Leandro, Eletra, Diego Mota, Marlison, Fabiano, Ligia.**

Obrigada a todos os meus amigos do **GERES: Karina, Miguel, Rafa, Serena, Tônico, Poli, Erick, Ju, Kalena e Diego**, pelas amizades, dicas, ajuda nos trabalhos

de disciplina, conselhos e grandes “helps” neste trabalho, especialmente ao Diego Muniz, Vivi, Kalena.

Obrigada do fundo do meu coração **Diego Muniz!** Por sua colaboração que sem dúvidas foi fundamental nessa jornada. Por cada perfeita cirurgia para o implante do datalogger nas serpentes que você fez, por nunca perder nenhuma delas, pelas horas que você se dedicou a isso, nos finais de semana, feriados... Obrigada pelo seu compromisso e pelo excelente trabalho profissional que você fez. Obrigada também pela grande amizade, companheirismo e parceria.

Sou imensamente grata com você, **Kalena!** Não somente pela baita força, dicas e ensinamentos neste trabalho, mas também pelo grande carinho por todo esse tempo que nos conhecemos, pela nossa amizade, companheirismo...

Obrigada **Vivi Garcia!** Pela colaboração desde o início deste trabalho.

Obrigada **Juliana Passos!** Pelo grande auxílio nas cirurgias e cuidados pós-cirúrgicos.

Muito obrigada **Silara!** Tão pequenina, mas de coração enooorme. Agradeço por toda força, dicas, apoio, amizade, pelas correções e por ser minha marida por algumas vezes hahahaha.

Muito obrigada **Lucas!** Pelas risadas kkkk, por me ensinar o qui quadrado e por todas as demais ajudas. Obrigada por sempre poder contar com você.

Obrigada **Cristiene!** Pelas várias edições de fotos e demais auxílios.

Obrigada **Kely Kishi!** Por me aturar tantas vezes pedindo artigos, escaneamento e muito mais, japinha.

Muito obrigada **Bruno Costa!** Pelas coletas de dados, por me ajudar tanto com os bichos. Obrigada por todo o tempo que me ajudou. Sem sua ajuda o andamento deste projeto teria sido muito mais difícil.

Obrigada **Jesús Ortega (Chucho)!** Pela imensa colaboração e contribuição para nosso artigo. Obrigada por essa parceria, com certeza foi de fundamental importância para o término do meu trabalho.

Obrigada **Karina Kasperoviczus e Rafael Bovo** pelas sugestões no início do projeto.

Obrigada **Henrique Braz** pela revisão do inglês e contribuição científica no artigo.

Agradeço ao professor **Luiz Henrique Florindo** da Unesp! Pela oportunidade do estágio, por me ensinar tudo sobre os dataloggers utilizados neste projeto.

Agradeço a **Cevap**(Botucatu) e a **Univap** (São José dos Campos) pela doação de muitos animais, especialmente as fêmeas prenhes estudadas aqui.

Agradeço a **Fundação Butantan**, pelo fornecimento dos materiais e equipamentos utilizados neste projeto.

Agradeço a **Capes**, pelo apoio financeiro durante esse período do mestrado.

Bom, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho acontecesse.

Obrigada!

*O que faz o biólogo é o que ele pensa a respeito
do que vê, a olho nu, ou ao microscópio.*

Anthony Joseph Mazzeo

RESUMO

MARINHO, P.S. **Influência do ciclo reprodutivo na biologia termal de *Crotalus durissus neotropical* (Serpentes, Viperidae) em cativeiro.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

As serpentes são animais ectotérmicos capazes de modificar seu comportamento termorregulatório e consequentemente sua temperatura corpórea para otimizar o desempenho de determinadas atividades, dentre elas, a reprodução. Segundo vários estudos, a reprodução é um dos fatores fisiológicos mais influenciados pela seleção de temperatura corpórea em Squamata. Fêmeas reprodutivas de muitas espécies têm apresentado termofilia gestacional. Esse comportamento tem corroborado a hipótese de manipulação materna da temperatura ótima para o desenvolvimento embrionário, com isso, a fêmea garante o fenótipo da prole e seu sucesso reprodutivo. Aqui investigamos a influência do status reprodutivo na biologia termal de fêmeas de *Crotalus durissus* em cativeiro semiextensivo. Para isso, foram utilizados sensores de temperatura interna (datalogger) inseridos cirurgicamente na cavidade celomática de fêmeas prenhes e não prenhes. As análises dos dados demonstraram que fêmeas prenhes mantiveram a média de temperatura corpórea significativamente mais elevadas do que fêmeas não prenhes no verão. No entanto, a variação da T_c de fêmeas prenhes não difere de fêmeas não prenhes. O benefício mais frequentemente citado sobre a evolução da viviparidade, é que fêmeas prenhes podem acelerar o desenvolvimento embrionário por meio da termorregulação. A elevação e estabilidade da temperatura corpórea durante a gestação têm sido consideradas o mecanismo primordial para assegurar o desenvolvimento embrionário. Desta forma, aumenta o fitness da prole e garante a viabilidade da ninhada. Os dados apresentados aqui demonstram que a condição reprodutiva de fêmeas prenhes de *Crotalus durissus* tem grande influência sobre a seleção de temperaturas mais elevadas, corroborando com a hipótese de que fêmeas alteram o comportamento termorregulatório quando estão prenhes.

Palavras-chave: 1. Termorregulação 2. Reprodução 3. Ciclo reprodutivo 4. *Crotalus durissus* 5. Temperatura corpórea.

ABSTRACT

MARINHO, P.S. **Influência do ciclo reprodutivo na biologia termal de *Crotalus durissus neotropical* (Serpentes, Viperidae) em cativeiro.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Snakes are ectothermic animals capable of modifying their thermoregulatory behavior and consequently their body temperature to optimize the performance of certain activities, among them, reproduction. According to several studies, reproduction is one of the physiological factors most influenced by the selection of body temperature in Squamata. Reproductive females of many species have shown gestational thermophily. This behavior has corroborated the hypothesis of maternal manipulation of the optimum temperature for embryonic development, therefore, the female assures the phenotype of offspring and their reproductive success. Here we investigate the influence of reproductive status on the thermal biology of *Crotalus durissus* females in semiextensive captivity. For this, internal temperature sensors (dataloggers) were inserted surgically in the coelomic cavity of pregnant and non-pregnant females. Data analyzes demonstrated that pregnant females maintained significantly higher mean body temperature than non-pregnant females in the summer. However, the body temperature variation of pregnant females does not differ from non-pregnant females. The most frequently cited benefit on the evolution of viviparity is that pregnant females can accelerate embryonic development through thermoregulation. The elevation and stability of body temperature during pregnancy have been considered the primordial mechanism to ensure the embryonic development. Thus, it increases the fitness of offspring and ensures the viability of the clutch. The data presented here, demonstrate that the reproductive condition of pregnant females of *Crotalus durissus* has great influence on the selection of higher temperatures, corroborating with the hypothesis that females alter the thermoregulatory behavior when they are pregnant.

Keywords: 1. Thermoregulation 2. Reproduction 3. Reproductive cycle 4. *Crotalus durissus* 5. Body temperature.

Sumário

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2	CAPITULO 1. EFFECTS OF GESTATION ON THE BODY TEMPERATURE OF THE 1 NEOTROPICAL RATTLESNAKE <i>CROTALUS DURISSUS</i>.....	18
2.1	ABSTRACT.....	20
2.2	INTRODUCTION.....	21
2.3	MATERIALS AND METHODS	23
2.3.1	Study site.....	23
2.3.2	Study specie	23
2.3.3	Specimens and reproductive status.....	25
2.3.4	Snake body temperatures.....	25
2.3.5	Operative environmental temperatures T_e (thermal models).....	26
2.3.6	STATISTICAL ANALYSIS.....	27
2.4	RESULTS.....	27
2.4.1	Reproductive status.....	27
2.5.2	Thermal models.....	28
2.4.3	Daily variation in body, model, and air temperature.....	29
2.4.4	Seasonal variation in body temperatures.....	32
2.5	DISCUSSION.....	36
2.5.1	Daily pattern of body temperature variation.....	36
2.5.2	Effects of reproductive status on body temperature.....	37
3	CONCLUSÃO GERAL.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41

1. INTRODUÇÃO GERAL

A temperatura corpórea (T_c) é um dos fatores ecofisiológicos que afeta fortemente o desempenho de animais ectotérmicos (ANGILLETTA et al., 2002). Os animais regulam sua T_{cem} faixas estreitas até alcançar a temperatura ideal ou ótima para as funções normais do organismo (CABANAC, 2006). Desta forma, a temperatura torna-se um elemento crucial para o desempenho e sobrevivência dos indivíduos (HUEY, STEVENSON, 1979; ANGILLETTA et al., 2002). A regulação da T_c para níveis que permitam atividades normais pode provir de reações químicas do metabolismo (endotermia) ou por alteração no fluxo de calor interno e externo do animal por termorregulação comportamental (ectotermia) (ver SPEAKMAN, 2001; POUGH et al., 2003). Contudo, os animais utilizam diferentes mecanismos para alcançar a estabilidade da T_c (SPEAKMAN, 2001).

Vertebrados ectotérmicos obtêm a energia necessária para manter o equilíbrio térmico a partir de recursos externos, ou seja, fontes de calor presentes no ambiente. As principais fontes de energia são o sol e objetos quentes (e.g. solo, rochas), em que o animal pode obter o calor por meio de contato direto do corpo (condução) (HUEY et al., 1989). No entanto, ocorrem variações na T_c , pois a capacidade de termorregulação depende da disponibilidade de sítios térmicos e radiação solar, que varia geográfica e temporalmente (GREGORY, 1982).

Atualmente, é bem estabelecido que vertebrados ectotérmicos utilizam mecanismos comportamentais para regular a temperatura do corpo (POUGH et al., 2003), regulando-a com precisão considerável, porém, o nível em que a regulação ocorre varia entre as espécies (COWLES, BOGERT, 1944). Tais mecanismos envolvem a seleção de microhabitat, ajustes posturais/orientação do corpo (COWLES, BOGERT, 1944; PETERSON et al., 1993), agregação com outros indivíduos (GRAVES, DUVALL, 1987), além de ajustes fisiológicos que também são realizados para aquisição de temperaturas adequadas para o indivíduo (BARTHOLOMEW, LASIEWSKI, 1965; LADYMAN et al., 2003; ANDRADE, ABE, 2006). A capacidade de regulação da T_c ajuda a reduzir o impacto da variação temporal e espacial da temperatura ambiente (GREGORY, 1982; ANGILLETTA et al., 2002). No entanto, a T_c é limitada pela distribuição de temperaturas operativas (possibilidades de T_c disponíveis para um animal ectotérmico no ambiente) e

também influenciada pela demanda de forrageio e presença de predadores (GRAVES, DUVALL, 1993; BEAUPRE, 1995).

As serpentes são animais ectotérmicos capazes de modificar seu comportamento termorregulatório e consequentemente sua temperatura corpórea a fim de otimizar o desempenho de determinadas atividades como: locomoção, digestão (STEVENSON et al., 1985; TATTERSALL et al., 2004), e reprodução (SHINE, 1980; GIER et al., 1989; CHARLAND, GREGORY, 1990; LOURDAIS et al., 2004). Mas como todo vertebrado ectotérmico, as serpentes estão sujeitas às variações diárias e sazonais em sua temperatura corpórea, o que afeta de forma significativa muitas funções biológicas, além de influenciar de forma negativa ou positiva as atividades exercidas pelo animal (STEVENSON et al., 1985; SLIP, SHINE, 1988).

A reprodução é um dos fatores fisiológicos mais influenciados pela seleção de temperatura corpórea, não somente em serpentes, mas em répteis da ordem Squamata (SHINE, 1980; BEUCHAT, 1986; GREGORY, 1995; CHIARIAVIGLIO, 2006). Alguns estudos relatam a tendência de fêmeas grávidas manterem T_c mais elevada e menos variável que fêmeas não reprodutivas (BLOUIN-DEMERS, WEATHERHEAD, 2001; BROWN, WEATHERHEAD, 2000; LOURDAIS et al., 2004). Por exemplo, fêmeas grávidas de *Crotalus horridus* diferem de fêmeas não reprodutivas e machos, mantendo a T_c mais elevada e selecionando áreas mais quentes para termorregular e desta forma, aumentam a frequência de aquecimento (REINERT, 1984; REINERT, ZAPPALORTI, 1988). Peterson e colaboradores (1993) estudaram a espécie *Thamnophis sirtalis* em gradiente térmico de laboratório. Seus resultados mostraram que as fêmeas selecionaram temperaturas altas após emergir da hibernação artificial. Além disso, quando se tornaram reprodutivas, as fêmeas selecionavam abrigos quentes e mantiveram a T_b elevada até a parturição, após isso, o declínio da T_c foi reduzido abruptamente.

A temperatura experimentada pelos embriões durante o desenvolvimento pode afetar diversas características fenotípicas como período de nascimento, tamanho e crescimento dos filhotes, desempenho locomotor e comportamento (revisado por BOOTH, 2006) que, por fim, pode resultar na redução do *fitness* da prole (e.g. MADSEN, SHINE, 2000; ULLER et al., 2011). Muitos estudos têm apoiado a idéia de que as mães podem manipular a temperatura de

desenvolvimento dos seus descendentes por meio do comportamento (Shine, 1995). Por exemplo, em espécies ovíparas, as fêmeas podem escolher ninhos com temperaturas mais favoráveis ou cavar ninhos em diferentes profundidades (SHINE, HARLOW, 1996; TELEMCO et al., 2009). Em espécies vivíparas, fêmeas grávidas podem manipular a temperatura de desenvolvimento por meio da termorregulação comportamental (BEUCHAT, 1986; SCHWARZKOPF, ANDREWS, 2012a; SCHWARZKOPF, ANDREWS, 2012b; SHINE, 2012). Tal comportamento promove a manutenção de temperaturas mais estáveis e/ou mais elevadas para acelerar o desenvolvimento embrionário (SHINE, 1985; 2012) e proteger a prole contra variações térmicas bruscas (KEARNEY et al., 2009). As vantagens geradas por tal comportamento materno podem proporcionar benefícios ao *fitness* da própria fêmea que carrega a prole. Tais benefícios envolvem a redução no período gestacional, que por vez, reduz os custos associados à reprodução (SCHWARZKOPF, SHINE, 1991; SCHWARZKOPF, ANDREWS, 2012a; SCHWARZKOPF, ANDREWS, 2012b; SHINE, 2012), principalmente aqueles relacionados à sobrevivência (e.g. maior risco de predação, devido à mobilidade reduzida pelo incremento na massa corpórea) (SHINE, 1980, DAYANANDA et al., 2017).

Diante deste panorama, é notória a importância de estudos sobre ciclos reprodutivos e ecologia termal, tendo em vista a grande influência que um fator exerce sobre o outro. Além disso, estudos nessa área conduzidos no Brasil ainda são escassos. Assim, *Crotalus durissus* torna-se um excelente modelo de investigação de táticas termorregulatórias associadas ao ciclo reprodutivo, uma vez que, é uma espécie abundante na natureza, com alta frequência de chegada ao Instituto Butantan. Além disso, o ciclo reprodutivo é bem definido como sazonal bienal (ALMEIDA-SANTOS, ORSI, 2002) e sua conformação robusta facilita o estudo com técnicas cirúrgicas. Os dados obtidos neste trabalho serão de fundamental importância para compreensão da ecofisiologia de um Viperídeo neotropical, disponibilizando informações inéditas sobre as relações térmicas e sua influência no sucesso reprodutivo.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do ciclo reprodutivo sobre a variação da temperatura corpórea de fêmeas de *Crotalus durissus* em cativeiro semiextensivo, especificamente: 1- Investigar a mudança sazonal na temperatura corpórea de fêmeas prenhes e não prenhes 2- Descrever o

perfil diário de Tc e 3- Verificar em qual estágio da prenhez as fêmeas alteram o comportamento termorregulatório.

2 CAPITULO 1

EFFECTS OF GESTATION ON THE BODY TEMPERATURE OF
THE NEOTROPICAL RATTLESNAKE *CROTALUS DURISSUS*

Foto: Felipe Riente

EFFECTS OF GESTATION ON THE BODY TEMPERATURE OF THE NEOTROPICAL
RATTLESNAKE *CROTALUS DURISSUS*

Patrícia S. Marinho^{1,3}, Jesús E. Ortega Chinchilla², Selma M. Almeida-Santos³

¹Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres,
Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade de São Paulo, Avenida Orlando Marques de Paiva, Cidade
Universitária - CEP 8705508-000 - São Paulo, SP, Brazil; E-mail:
patriciamarinho@usp.br. Send reprint requests to this address.

²Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo,
Rua do Matão, Travessa 14, nº 321, Cidade Universitária - CEP 05508-090 –
São Paulo, SP, Brazil; E-mail: chucho.ortega@gmail.com.

³Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan – Avenida Vital Brazil, 1.500,
Butantã, CEP 05503900, São Paulo, SP, Brazil; E-mail:
selma.santos@butantan.gov.br.

Keywords: Daily variation, Embryonic development, Reproduction, Operative
temperature, Seasonal variation, Pregnancy

2.1 ABSTRACT

Changes in body temperature of reproductive females are well documented in squamate reptiles. However, the direction of these changes varies across squamate species. Pregnant females may exhibit lower or higher (and less variable) body temperatures than those of nonpregnant females. In some species, pregnancy has no detectable effect on female body temperatures. In this study, we compared the body temperature of female rattlesnakes (*Crotalus durissus*) in different reproductive statuses (pregnant and nonpregnant) to investigate whether pregnancy influence the body temperature of female snakes. We measured body temperatures of female rattlesnakes kept in a semi-natural outdoor enclosure during the summer and spring of 2016 and the summer of 2017. Pregnant females selected higher mean body temperatures 38 than those of nonpregnant females. Moreover, we found significant differences in body temperatures among seasons. Body temperatures in summer 2017 were higher than in other seasons. Variance in body temperature did not differ between pregnant and nonpregnant females. Our results show that the reproductive status has a major influence on the selection of higher body temperatures by *C. durissus*. Moreover, our results agree with the hypothesis that females alter their thermoregulatory behavior during pregnancy. Further studies are necessary to evaluate the consequences of body temperature changes during pregnancy for both the offspring and mother.

2.2 INTRODUCTION

Changes in body temperature (T_b) as a function of female reproductive status are well documented in squamate reptiles (Beuchat, 1986; Charland, 1995; Mathies and Andrews, 1997; Chiaraviglio, 2006; Gardner-Santana and Beaupre, 2009; Tattersall et al., 2016). However, the direction of these changes varies among species. In some species, pregnant females exhibit lower body temperatures than nonpregnant females and/or males (Beuchat, 1986; Mathies and Andrews, 1997). On the other hand, pregnant females of some species exhibit higher and/or less variable body temperatures than nonpregnant females or males (Charland and Gregory, 1990; Chiaraviglio, 2006). However, pregnancy has no detectable effect on the thermoregulation of some species (Bovo et al., 2010). Viviparous females retain their embryos in utero throughout development and give birth to fully formed young. In this context, pregnant females may accelerate embryonic development (and decrease the total length of gestation) by selecting higher temperatures through behavioral thermoregulation (Shine, 1985; Dorcas and Peterson, 1998; Shine, 2012). By reducing gestation time, parturitions could occur at a time more favorable to offspring survival (Andrews, 1997).

Two hypotheses have recently been proposed to explain changes in body temperature during gestation time. The “Maternal Manipulation Hypothesis” proposes that embryos are sensitive to temperature fluctuations during development and, therefore, selection should promote female traits that enable embryos to develop under more favorable or stable conditions (Shine, 1995, 2012). In addition to precise thermoregulation during pregnancy, other maternal traits can improve offspring viability as nest-site selection (in oviparous species) and shivering thermogenesis (Shine and Harlow, 1996; Shine et al., 1997; Webb et al., 2006). The “Selfish Mother

Hypothesis” proposes that females change their thermoregulatory behavior during pregnancy to maximize their lifetime reproductive success (Schwarzkopf and Andrews, 2012a, 2012b). Pregnant females may change their thermoregulatory behavior, not as a strategy to increase offspring fitness, but because their movement is restricted or their survival compromised by the burden imposed by pregnancy. For instance, pregnant females are often more susceptible to predation because of reduced performance (Shine, 1980; Gardner-Santana and Beaupre, 2009; Schwarzkopf and Andrews, 2012). Rattlesnakes have been intensively used as model organisms for investigating several general issues on ecology, physiology, and evolution (Schuett et al., 2017). Although most studies focus on North American rattlesnakes, various aspects of the natural history of the Neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus*) have also been investigated (Salomão et al., 1995; Almeida-Santos and Salomão, 1997; Almeida-Santos and Orsi, 2002; Almeida-Santos et al., 2004; Tozetti and Martins, 2008; Hoyos and Almeida-Santos, 2016). However, studies on the thermal biology of rattlesnakes are limited to temperate species (Gier et al., 1989; Charland and Gregory, 1990; Wills and Beaupre, 2000; Gardner-Santana and Beaupre, 2009). Here, we investigate the daily pattern of body temperature in pregnant and nonpregnant females of the Neotropical rattlesnake *C. durissus*. Specifically, we tested the hypothesis that pregnancy affects the body temperature of female snakes.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 Study site. –This study was conducted at the serpentarium of the Instituto Butantan (São Paulo state, southeastern Brazil). The serpentarium is a semi-natural outdoor enclosure with an open area of 500 m² divided into three compartments (Fig. 1A), each of the mintended for maintenance and public exposure of a different snake species *C. durissus*, *Bothrops jararaca*, and *Boa constrictor*. The rattlesnake enclosure comprises an area of 183.22 m² within the serpentarium, and it mimics semi-natural conditions as sandy soil, tree vegetation, shrubs, clusters of rocks, a water body that runs through the enclosure, and artificial shelters (igloos) made of concrete (Fig. 1C). Although the rattlesnake enclosure has no artificial heating system, it receives direct sunlight exposure throughout the year. Therefore, snakes are subject to natural variations in photoperiod and temperature and can freely move into a sun-shade mosaic.

2.3.2 Study species. -The rattlesnake *C. durissus* is a robust, large-sized (up to 2.0 m body size; Marinho et al., 2009) viperid snake widely distributed in the Neotropical region, from Mexico to northern Argentina (Campbell and Lamar, 2004). In Brazil, *C. durissus* inhabits open areas of the Cerrado (Brazilian Savannah) and Caatinga domains (Campbell and Lamar, 2004). Female *C. durissus* are viviparous and exhibit biennial seasonal reproductive cycle (Almeida-Santos and Orsi, 2002). Females initiate vitellogenesis in late summer, mate in autumn, store sperm in the oviducts over winter, and ovulate in spring (Almeida-Santos and Salomão, 1997; Almeida-Santos and Orsi, 2002; Almeida-Santos et al., 2004). Pregnancy occurs in spring and summer, and parturitions occur in summer (Almeida-Santos and Orsi, 2002).

Figure 1. External view of the Instituto Butantan serpentarium (A). Snake carcass and a water-filled copper pipe (physical model) (B). Schematic drawing of the *C. durissus* enclosure showing the microhabitats and the distribution of the physical models (C).

Source: Cristiene Martins (Figure A); Ana Barbara (Figure C).

2.3.3 Specimens and reproductive status.- We studied 17 female *C. durissus* collected in São Paulo state, southeastern Brazil. The snakes were collected and brought to the Instituto Butantan by lay persons during the summer and spring of 2016 and during the summer of 2017. We assessed female reproductive status through ultrasonographic scans using a portable ultrasound system with a 7.5MHz linear transducer (GE Logiq100 Pro, General Electric Company). Ultrasonographic evaluations were performed in early summer and spring 2016. Females were classified as pregnant if they had oviductal developing embryos and as nonpregnant if they had ovarian follicles. All nonpregnant females were in primary vitellogenesis (i.e., ovarian follicles smaller than 10 mm; Almeida-Santos and Orsi, 2002). Pregnant females ranged in size from 900 to 930 mm snout-vent length (SVL; mean = 920.0 ± 1.4 mm) and had body mass ranging from 517 to 1,363 g (mean = 796.66 ± 323.95 g). Nonpregnant females ranged in size from 800 to 1,100 mm SVL (mean = 950.5 ± 9.4 mm) and had body mass ranging from 510.0 to 1394.3 g (mean = 871.4 ± 330.4 g). Pregnancy of rattlesnakes lasts for 4 to 5 months (i.e., up to 150 days; Almeida-Santos and Orsi, 2002). To assess body temperature throughout gestation, we divided the total gestation time into three stages (early, mid, and late pregnancy).

2.3.4 Snake body temperatures. - Temperature-sensitive dataloggers (ibutton WatchDog®2k - B100; 1.6 cm in diameter and mass of 3g) were surgically implanted in the body cavity during the summer/spring 2016 and summer 2017. A small incision was made in the lateral edge of ventral scales of anesthetized females (Reinert and Cundall, 1982). The dataloggers were intraperitoneally implanted, and the incision was sutured. In pregnant females, a portion of the uterus was everted to expose a developing embryo (adapted from Mathies and Andrews, 1997). We then determined

the embryonic developmental stage following criteria by Hubert and Dufaure (1968) for *Vipera aspis*. Next, the uterine portion was reinserted in the body cavity, the sensors were implanted, and the incision was sutured. We returned snakes to their enclosure after a post-surgery recovery period of approximately one week. The dataloggers were programmed to record body temperatures every two hours, totaling 12 records per day. At the end of each summer, the dataloggers were removed from each female following procedures similar to those described above. The body temperature records were extracted from the dataloggers using SpecWare 9 Basic software (Spectrum Technologies, Inc.).

2.3.5 Operative environmental temperatures T_e (thermal models).– We compared the potential T_b available to the snakes with the actual temperatures observed (Charland and Gregory, 1990). For this, we used physical models made of water-filled copper pipes, with 60 cm long and 16 cm in diameter (Bovo et al., 2012). To check the accuracy of our physical models, we compared their thermal profiles to a freshly dead *C. durissus* (Bovo et al., 2012). Temperature dataloggers were inserted inside the snake carcass and in the models. We sampled snake carcass and copper model temperatures under similar conditions for heat exchange/equilibration expected to occur in nature (Bovo et al., 2012). We then took temperature readings from the dataloggers every 15 min for 24 h (Fig. 1B).

To sample the T_e 's available for the rattlesnakes, we distributed six physical models along the microhabitats (thermal sites) most commonly used by *C. durissus* at the enclosures (Gomes and Almeida-Santos, 2012). We placed these physical models exposed to solar radiation (leaning against the walls), at shaded areas on the ground,

and inside the shelters (igloos and rocks) (Fig. 1C). The temperature of these models was recorded daily at 2-hour intervals.

2.3.6 Statistical analyses.— All statistical tests were performed using Statistica, version 7.0 (StatSoft Inc. 2004) and GraphPad Prism, version 5.0 (GraphPad Software Inc. 2007). Values are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) and the significance level for all statistical tests was set at $\alpha = 0.05$. We used linear regression to analyze the relationship between snake body temperatures and operative temperatures and thus to provide insight on the body temperature modulation. We calculated the mean T_b s for every 2 hours to generate a mean daily profile of body temperature representative of the gestation period. We tested for differences in mean T_b of pregnant and nonpregnant females using one-way analysis of variance (ANOVA). Comparisons were made both within and among seasons.

2.4 RESULTS

2.4.1 Reproductive status.— In summer 2016, we detected four nonpregnant females and one pregnant female. In spring 2016, we identified three nonpregnant females and one pregnant female. In summer 2017, we detected three nonpregnant females and five pregnant females. Pregnant females were at different gestational stages (Table 1). Therefore, we recorded body temperatures of pregnant females from early to late stages ($n = 1$), mid to late stages ($n = 2$), and at late stages ($n = 4$).

Table 1. Gestational and embryonic developmental stages for pregnant *C. durissus*. Embryos were staged following criteria by Hubert and Dufaure (1968) Note that the embryonic stage 43 is the last stage in the Hubert and Dufaure staging system.

Season	Females ID	Gestational stage (embryonic stage)
Summer 2016	16	Late (stages 42 - 43)
Spring 2016	34	Early (stages 05 - 27)
Summer 2017	36	Mid (stages 28 - 32)
		Late (stages 33 - 43)
	38	Late (stages 38 - 43)
	34	Mid (stages 28 - 32)
		Late (stages 33 - 43)
	41	Late (stages 40 - 43)
	44	Late (stages 42 - 43)

2.4.2 Thermal models. –The temperatures of the snake carcass and copper model were significantly correlated ($n = 100$; $r = 0.935$; $P = 0.004$; Fig. 2). The mean temperature of the model ($12.16 \pm 0.33^\circ\text{C}$) and the mean temperature of the snake carcass ($10.88 \pm 0.29^\circ\text{C}$) differed significantly ($t_{(200;0.05)} = 2.911$ $P = 0.004$). Therefore, our models tended to slightly overestimate snake temperature. We considered that the operational temperatures obtained from the thermal models were adequate and gave us a better resolution of the landscape temperature, compatible with the body size of individuals.

Figure 2. Relationship between snake and model temperatures collected over 24 h..

2.4.3 Daily variation in body, model, and air temperature. - We recorded the daily pattern of T_b of pregnant and nonpregnant females in the three studied periods (summer 2016, spring 2016, and summer 2017). In addition, we recorded the daily pattern of operative and air temperatures in the same periods. The T_b of female *C. durissus* varied throughout the day. The snake T_b 's oscillated between being higher or lower than the model temperatures. Snake T_b was higher than that of the models, but the temperature of the models surpassed T_b between 10:00 and 16:00 h. Snake body temperatures slowly declined after 16:00h (Fig. 3).

We analyzed the temperature data for each season separately and found significant differences among models, air, and body temperatures (per reproductive stage). In summer 2016, the models (T_e) registered the highest temperatures (ANOVA, $F_{(3,1343)} = 3.731$ $P = 0.0109$), followed by nonpregnant and pregnant

females (Fig. 4A). In spring 2016, we found that pregnant females showed the highest temperatures (ANOVA, $F_{(3,2502)} = 35.03$ $P < 0.0001$, Fig. 4B). In summer 2017, the highest temperatures recorded corresponded to the operative temperatures (ANOVA, $F_{(3,2780)} = 57.17$ $P < 0.0001$; Fig. 4C).

Figure 3. Daily variation in body, operative, and air temperature for rattlesnakes, *C. durissus*. Summer 2016 (A), Spring 2016 (B), and Summer 2017 (C).

Figure 4. Variation in operative, air, and body temperatures (pregnant and nonpregnant females) during the study period for rattlesnakes, *C. durissus*. Summer 2016 (A), Spring 2016 (B), and Summer 2017 (C).

2.4.4 Seasonal variation in body temperatures. - The snake T_b differed between reproductive status in spring 2016 and summer 2017 (Table 2). In these seasons, pregnant females showed higher temperatures than nonpregnant females (Fig. 5). However, T_b did not differ between reproductive status in summer 2016 (Table 2). We also found significant differences in T_b among seasons (ANOVA, $F_{(5,2730)} = 60.77$ $P < 0.0001$). Body temperatures in summer 2017 were higher than the other seasons. Moreover, female T_b in spring 2016 was higher than T_b in summer 2016 (Fig. 5). We found no effect of the reproductive status on the precision of thermoregulation during the summers of 2016 and 2017. However, pregnant females exhibited significantly higher precision of thermoregulation (=lower variance) compared to the spring variation (summer: $S^2 = 5.42$ spring: $S^2 = 12.32$). Nonpregnant females showed no significant seasonal changes in the precision of thermoregulation (Table 2). We analyzed T_b throughout pregnancy for a single female. The snake T_b was higher at mid and late stages than in early stage of gestation (ANOVA $F_{(2,1410)} = 83.84$ $P < 0.001$; Fig. 6). For each season, mean T_b (nonpregnant and pregnant females) were positively correlated with the mean operative temperature ($P < 0.0001$ for all cases, Table 2; Fig. 7).

Table 2. Body temperature (T_b), air temperature (T_a), and operative temperature (T_e) for rattlesnakes, *C. durissus*. The precision was calculated as the variance (S^2) of each individual mean T_b . Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Season	Reproductive status	T_b		T_a	T_e	T_b VS T_e		P-value
		Mean $\pm$ SD	S^2	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	r	b	
Summer 2016	Nonpregnant	24.77 $\pm$ 1.78	3.16	24.16 $\pm$ 4.49	24.83 $\pm$ 3.08	0.70	0.32	0,0109
	Pregnant	24.35 $\pm$ 2.27	5.15			0.45	0.35	
Spring 2016	Nonpregnant	24.24 $\pm$ 2.09	4.36	22.39 $\pm$ 6.75	23.16 $\pm$ 3.93	0.40	0.21	0,0001
	Pregnant	25.46 $\pm$ 3.51	12.32			0.54	0.48	
Summer 2017	Nonpregnant	25.92 $\pm$ 2.36	5.56	24.62 $\pm$ 1.21	26.86 $\pm$ 4.48	0.75	0.39	0,0001
	Pregnant	26.45 $\pm$ 2.33	5.42			0.78	0.40	

Figure 5. Seasonal variation in body temperature of pregnant and nonpregnant rattlesnakes, *C. durissus*

Figure 6. Variation in body temperature throughout pregnancy in a single pregnant rattlesnake, *C. durissus*

Figure 7. Relationship between body temperature (T_b) and operative temperature (T_e) in different seasons. (A) Summer 2016. (B) Spring 2016 (C) Summer 2017. See Table 2 for statistical tests.

2.5 DISCUSSION

2.5.1 Daily pattern of body temperature variation. – Daily variation in T_b of *C. durissus* was similar to the "oscillating" pattern reported by Peterson (1987) in free-ranging garter snakes, *T. elegans vagrans*. In the morning, the snakes keep their T_b higher than T_e . This thermal profile suggests that snakes are able to maintain T_b s at higher levels than the available temperatures (T_e) for the period between 00:00 and 06:00 h, when environmental temperatures (T_a and T_e) are cooler (Fig. 3). In the early afternoon, T_e s begin to rise and peak between 14:00 and 16:00 h. At this time, snakes' T_b s are cooler than T_e . The divergence between the daily variation in T_b and the physical model indicates that rattlesnakes are able to modify their T_b by selecting cooler microenvironments (Charland and Gregory, 1990). This strategy may be used to avoid potentially lethal temperatures. In nature, *C. durissus* apparently reduce the risks of overheating by selecting cooler microhabitats during the day and avoiding lower temperatures at night by selecting warmer microhabitats (Tozetti and Martins, 2008). After 16:00 h, environmental temperatures decline, and the snakes maintain body temperatures higher at night. T_b s often exceeded model temperatures by several degrees Celsius, presumably because snakes could select warmer microhabitats and carry out behavioral adjustments as coiling (Peterson, 1987) and/or aggregation (P. S. Marinho, pers. obs.). For instance, the mean T_b of aggregated individuals of *C. viridis viridis* was higher than in solitary conspecific under similar conditions, as a result of the reduction in surface-to-volume ratio (Graves and Duvall, 1987). By engaging in postural adjustments as body coiling, snakes may reduce heat loss and maintain thermal inertia (Ayers and Shine, 1997). Both the thermal environment and the behavior of the snakes determine the daily

patterns of body temperature variation (Peterson, 1987). The importance of behavior in determining *T_b* patterns generally increase as the operative temperatures increase. This relationship was evident in this study as *T_b*s and model temperatures were highly correlated.

2.5.2 Effects of reproductive status on body temperature. - The most cited benefit of the evolution of viviparity in reptiles is that pregnant females can accelerate embryonic development through thermoregulation (Shine, 1983, 1985). The elevation and stability of *T_b* during gestation have been considered as essential mechanisms to ensure embryonic development and enhance offspring fitness (Schwarzkopf and Shine, 1991; Lourdais et al., 2004; Gardner-Santana and Beaupre, 2009; Uller et al., 2011). In this scenario, we could expect that pregnant females would select higher and/or less variable body temperatures than nonpregnant females (Charland and Gregory, 1990). Our results corroborate this hypothesis. During the summer (when embryonic development and parturition occur; Salomão and Almeida-Santos, 2002), pregnant female *C. durissus* maintain higher *T_b*s than nonpregnant females. These results suggest that the seasonal reproductive cycle of female rattlesnakes (Almeida-Santos and Orsi, 2002) follows the premise of the benefits of selecting higher temperatures during gestation.

Our results agree with previous studies involving other species of snakes and lizards exhibiting gestational thermophily (Charland and Gregory, 1990; Tu and Hutchison, 1994; Lourdais et al., 2004; Crane and Greene, 2008; Woolrich-Piña et al., 2015). For instance, pregnant garter snakes (*T. sirtalis* and *T. elegans*) show higher mean body temperatures and thermoregulate more precisely than nonpregnant conspecific females (*i.e.*, less variable body temperature). Moreover,

these differences in thermoregulation persist throughout pregnancy and disappear shortly after parturition (Charland, 1995). Pregnant *C. viridis* also show higher mean body temperatures and high precision of thermoregulation compared to nonpregnant conspecific (Charland and Gregory, 1990). The variance of T_b in pregnant *C. durissus* does not differ from nonpregnant females. However, there was a significant reduction in body temperature variance of pregnant females between spring and summer (Table 1). According to Charland (1995), the accuracy of regulated T_b s may be as important as maintaining an optimum mean T_b .

Most species in which thermoregulation has been studied inhabit temperate regions. However, changes in body temperature of pregnant/gravid females also occur in a range of tropical snakes (e.g., Shine and Madsen, 1996; Luiselli and Akani, 2002; Chiaraviglio, 2006) and lizards (e.g., Tattersall et al., 2016; Dayananda et al., 2017). Thermoregulation in tropical snakes is relevant for certain activities and life-history attributes, even in thermally favorable environments (Luiselli and Akani, 2002). Previous studies have found that metabolic rates of reproducing females increase steadily as pregnancy proceeds (Birchard et al., 1984, DeMarco and Guillette, 1992). This increase may be related to the metabolic investment imposed by the costs of reproduction and maternal processes associated with the maintenance of embryonic development such as oxygen supply to embryos (Birchard et al., 1984). These data may explain the elevation of T_b throughout the gestation in the single pregnant female that we monitored during the entire gestational period. Increased oxygen consumption and weight-specific oxygen consumption at late pregnancy may indicate that fetal oxygen consumption is scaled to fetal and not to maternal weight (Birchard et al., 1984). We emphasize that the reproductive cycle of female *C. durissus* is markedly seasonal. Vitellogenic period is quite prolonged (from

late summer to winter), with ovulation and fertilization occurring in spring, and pregnancy in spring and summer (Salomão and Almeida-Santos, 2002). By emphasizing the fact that pregnant females maintain high *T_b*s, we assume that higher temperatures or more refined thermoregulatory behaviors are less important for non-reproductive females. The daily pattern of *T_b* of pregnant *C. durissus* is consistent with the timing of thermoregulatory activities previously observed in reproductive females (Salomão et al., 1995). Pregnant *C. durissus* probably increase basking during the day to keep high body temperatures overnight. Our results suggest that the reproductive status has a major influence on the selection of higher body temperatures by *C. durissus*. Moreover, our results agree with the hypothesis that females alter their thermoregulatory behavior during pregnancy (Shine, 1995). However, our data do not allow us to test either the "maternal manipulation hypothesis" (Shine, 2012) or the "selfish mother hypothesis" (Schwarzkopf and Andrews, 2012). This is the first study demonstrating the influence of reproductive status on thermoregulation of the Neotropical rattlesnake. Further studies should evaluate the costs and benefits associated with the change in *T_b* in the gestational period as well as to test the predictions of both the maternal manipulation and selfish mother hypotheses.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Diego Muniz for surgically implanting the temperature sensors in the snakes, Miguel Lobo for the helpful suggestions for classifying the gestational stages, Adriano Fellone for acquiring the dataloggers, Cristiene Martins for editing the pictures, and Henrique B. Braz for the English revision. This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) through a master's fellowship granted to P. S. Marinho. All procedures were approved by the

Ethics Committee on the Use of Animals of the University of São Paulo (approval number 4339200715) and Instituto Butantan (approval number 1185051115).

3 CONCLUSÃO GERAL

- As fêmeas prenhes de *Crotalus durissus* apresentam a média de temperatura corpórea mais elevada do que fêmeas não prenhes. Tal fato foi observado no verão – estação em que *C. durissus* finaliza o desenvolvimento embrionário e a parturição ocorre.
- A variação da Tc de fêmeas prenhes não diferiu em comparação com fêmeas não prenhes entre as estações. Embora, tenha havido grande redução de variação da Tc de fêmeas prenhes da primavera para o verão, esse fato indica que fêmeas prenhes tornam-se termorreguladoras mais precisas no período final da gestação.
- Uma fêmea prenhe que teve a Tc registrada desde o início da gestação, apresentou diferença de temperatura entre o início e final do desenvolvimento embrionário, sendo a Tc mais elevada nos períodos mais avançados da gestação. Dessa forma, isso corrobora, que a prenhez em *C. durissus* segue a premissa de seleção por temperaturas mais elevadas, assim como em outras espécies de clima temperado e tropical.
- Nossos dados não foram suficientes para apoiar fortemente a hipótese mais discutida na literatura (manipulação materna). No entanto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que fêmeas de *Crotalus durissus* alteram o comportamento termorregulatório quando estão prenhes. Porém, não podemos afirmar que esse comportamento seja em benefício exclusivo da prole, da mãe ou ambos.

REFERÊNCIA

- ALDRIDGE R. D. Environmental control of spermatogenesis in the rattlesnake *Crotalus viridis*. **Copeia**, v. 1975, n. 3, p. 493-496, 1975.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ORSI, A. M. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morfologia e função do oviduto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n.2, p. 109-112, 2002.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; LAPORTA-FERREIRA, I. L.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, D. C. Sperm storage in males of the snake *Crotalus durissus terrificus* (Crotalinae: Viperidae) in southeastern Brazil. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 139, p. 169-174, 2004.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMAO, M. G. Long term sperm storage in the female neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalidae). **Japanese Journal of Herpetology**, v. 17, p. 46-52, 1997.
- AYERS, D. Y.; SHINE, R. Thermal influences on foraging ability: body size, posture and cooling rate of an ambush predator, the python *Morelia spilota*. **Functional Ecology**, v. 11, p. 342–347, 1997.
- ANDRADE, D. V.; ABE, A. S. Fisiologia de répteis. In: **Herpetologia no Brasil**, v. 2: p. 171-182, 2006.
- ANDREWS, R. M. Evolution of viviparity: Variation between two sceloporine lizards in the ability to extend egg retention. **Journal of Zoology**, v. 243, p. 579–595, 1997.
- ANGILLETTA, M.J.; NIEWIAROWSKI, P.H.; NAVAS, C.A. The evolution of thermal physiology in ectotherms. **Journal of Thermal Biology**, v. 27, p. 249-268, 2002.
- ANGILLETTA, M.J.; WINTERS, R. S.; DUNHAM, A. E. Thermal effects on the energetics of lizard embryos: Implications for hatchling phenotypes. **Ecology**, v. 81, p. 2957–2968, 2000.
- BARTHOLOMEW, G. A.; LASIEWSKI, R.C. Heating and cooling rates, heart rate and simulated diving in the Galapagos marine iguana. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 16, p. 573 – 582, 1965.
- BEAUPRE, S. J. Effects of geographically variable thermal environment on bioenergetics of Mottled Rock Rattlesnakes. **Ecology**, v. 76, p. 1655–1665, 1995.
- BEUCHAT, C.A. Reproductive influences on the thermoregulatory behavior of a live-bearing lizard. **Copeia**, v. 4, p. 971–979, 1986.
- BIRCHARD, G. F.; BLACK, C. P.; SCHUETT, G. W.; BLACK, V. Influence of pregnancy on oxygen consumption, heart rate and hematology in the garter snake: implications for the “cost of reproduction” in live bearing reptiles. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 77A, p. 519 – 523, 1984.

BLOUIN-DEMERS, G., P. J. WEATHERHEAD. Thermal ecology of black rat snakes (*Elaphe obsoleta*) in a thermally challenging environment. **Ecology**, v. 82, p. 3025–3043, 2001.

BOOTH, D. T. Influence of incubation temperature on hatchling phenotype in reptiles. **Physiol. Biochem. Zool.**, v. 79, p. 274–28, 2006.

BOVO, R. P.; MARQUES, O. A. V.; ANDRADE, D. V. Does feeding or gestation affect the body temperature of the Golden lancehead, *Bothrops insularis* (Squamata, Viperidae) under natural conditions? **Zoologia**, v. 27, p. 973–978, 2010.

BOVO, R. P.; MARQUES, O. A.; ANDRADE, D. V. When basking is not an option: Thermoregulation of a viperid snake endemic to a small island in the south Atlantic of Brazil. **Copeia**, n. 3, p. 408–418, 2012.

BROWN, G. P.; WEATHERHEAD, P. J. Thermal ecology of northern water snakes, *Nerodia sipedon*: Population patterns and variation in relation to sexual size dimorphism. **Ecological Monographs**, v. 70, p. 311–330, 2000.

CABANAC, M. Adjustable set point: to honor Harold T. Hammel. **Journal of Applied Physiology**, v. 100, p. 1338–1346, 2006.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**, v. 2, Ithaca, NY, 2004, 962 p.

CHARLAND, M. B. Thermal consequences of reptilian viviparity - thermoregulation in gravid and non-gravid garter snakes (*Thamnophis*). **Journal of Herpetology**, v. 29, p. 383–390, 1995.

CHARLAND, M. B.; GREGORY, P. T. The influence of female reproductive status on thermoregulation in a viviparous snake, *Crotalus viridis*. **Copeia**, v. 4, p. 1089–1098, 1990.

CHIARAVIGLIO, M. The effects of reproductive condition on thermoregulation in the Argentina *Boa constrictor* (*Boa constrictor occidentalis*) (Boidae). **Herpetologica Monographs**, v. 20, p. 172–177, 2006.

COWLES, R. B.; BOGERT, C. M. A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 83, n. 5, p. 261–296, 1944.

CRANE, A. L.; GREENE, B. D. The effect of reproductive condition on thermoregulation in female *Agkistrodon piscivorus* near the northwestern range limit. **Herpetologica**, v. 64, p. 156–167, 2008.

DAYANANDA, B.; IBARGÜENGOYTÍA, N.; WHITING, M. J.; WEBB, J. K. Effects of pregnancy on body temperature and locomotor performance of velvet geckos. **Journal of Thermal Biology**, v. 65, p. 64–68, 2017.

DEMARCO, V.; GUILLETTE, L. J. JR. Physiological cost of pregnancy in a viviparous lizard (*Sceloporus jarrovi*). **The Journal of Experimental Zoology**, v. 262, p. 383-390, 1992.

DORCAS, M. E.; PETERSON, C. R. Daily body temperature variation in free-ranging rubber boas. **Herpetologica**, v. 54, p. 88-103, 1998.

GARDNER-SANTANA, L. C.; BEAUPRE, S. J. Timber rattlesnakes (*Crotalus horridus*) exhibit elevated and less variable body temperatures during pregnancy. **Copeia**, v. 2, p. 363-368, 2009.

GIER, P. J.; WALLACE, R. L.; INGERMANN, R. L. Influence of pregnancy on behavioral thermoregulation in the northern pacific rattlesnake *Crotalus viridis oregonus*. **Journal Experimental of Biology**, v. 145, p. 465-469, 1989.

GOMES, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Microhabitat use by species of the genera *Bothrops* and *Crotalus* (Viperidae) in semi-extensive captivity. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, p. 393-398, 2012.

GRAVES, M. B.; DUVALL, D. An experimental study of aggregation and thermoregulation in prairie rattlesnakes (*Crotalus Viridis Viridis*). **Herpetologica**, v. 43, n. 2: p. 259-264, 1987.

GRAVES, B. M.; DUVALL, D. Reproduction, rookery use, and thermoregulation in free-ranging, pregnant *Crotalus v. viridis*. **Journal of Herpetology**, v. 27, n. 1, p. 33-41, 1993.

GREGORY, P. T. Reptilian hibernation. In: GANS, C.; POUGH, F. H. (Eds.), **Biology of the Reptilia**. New York, Academic Press., 1982. p. 53-154.

HOYOS, M. A., AND S. M. ALMEIDA-SANTOS. The South-American rattlesnake *Crotalus durissus*: feeding ecology in the central region of Brazil. **Biota Neotropica** 16: 20140027. 2016

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

HUEY, R. B. Temperature, physiology, and the ecology of reptiles. In: GANS, C.; POUGH, F. H. (Eds.), **Biology of the Reptilia**. New York, Academic Press., 1982. p. 25-67.

HUEY, R. B.; PETERSON, C. R.; ARNOLD, S. J.; PORTER, W. P. Hot rocks and not-so-hot rocks: retreat-site selection by garter snakes and its thermal consequences. **Ecology**, v. 70, p. 931-944, 1989.

HUEY, R. B.; SLATKIN, M. Costs and benefits of lizard thermoregulation. **The Quarterly Review of Biology**, v. 51, p. 363-38, 1976.

HUEY, R. B.; STEVENSON, R. D. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: a discussion of approaches. **American Zoologist**, v. 19. p. 357-366, 1979.

ISAAC, L. A.; GREGORY, P. T. Thermoregulatory behavior of gravid and non gravid female grass snakes (*Natrix natrix*) in a thermally limiting high-latitude environment. **Journal of Zoology** (London), v. 264, n. 4, p. 403-409, 2004.

KEARNEY, M.; SHINE, R.; PORTER, W. P. The potential for behavioral thermoregulation to buffer "cold-blooded" animals against climate warming. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 10, p. 3835-3840, 2009.

LADYMAN, M.; BONNET, X.; LOURDAIS, O.; BRADSHAW, D.; NAULLEAU, G. Gestation, thermoregulation, and metabolism in a viviparous snake, *Vipera aspis*: Evidence for fecundity-independent costs. **Physiological and Biochemical Zoology** (Chicago), v. 76, n. 4, p. 497-510, 2003.

LOURDAIS, O.; SHINE, R.; BONNET, X.; GUILLON, M.; NAULLEAU, G. Climate affects embryonic development in a viviparous snake, *Vipera aspis*. **Oikos**, v. 104, p. 551-560, 2004.

LUISELLI, L.; AKANI, G. C. Is thermoregulation really unimportant for tropical reptiles? Comparative study of four sympatric snake species from Africa. **Acta Oecologica**, v. 23, p. 59-68, 2002.

MADSEN, T.; SHINE, R. Silver spoons and snake body sizes: prey availability early in life influences long-term growth rates of free-ranging pythons. **Journal Animal Ecology**, v. 69, p. 952-958, 2000.

MARINHO, C. E., S. M. ALMEIDA-SANTOS, S. C. YAMASAKI, AND P. F. SILVEIRA. 2009. Seasonal variation of peptidase activities in the reproductive tract of *Crotalus durissus terrificus*. **General and Comparative Endocrinology** 160: 84-92

MARTINS, L. S.; VERRASTRO, L.; TOZETTI, A. M. The influences of habitat on body temperature control in a southern population of *Liolaemus occipitalis* (Boulenger, 1885) in Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 9, n. 1, p. 9-13, 2014.

MATHIES, T.; ANDREWS, R. M. Influence of pregnancy on the thermal biology of the lizard, *Sceloporus jarrovi*: why do pregnant females exhibit low body temperatures? **Functional Ecology**, v. 11, p. 498-507, 1997.

PETERSON, C. R. Daily variation in the body temperatures of free-ranging garter snakes. **Ecological Society of America**, v. 68, p. 160-169, 1987.

PETERSON, C. R.; GIBSON, A. R.; DORCAS, M. E. Snake thermal ecology: the causes and consequences of body-temperature variation. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T. **Snakes: Ecology and Behavior**. McGraw-Hill, New York. 1993. p. 241-314.

POUGH, F. H., HEISER, J. B., JANIS, C. M., 2003. A vida dos vertebrados. 3ª Ed. **Atheneu Editora**, São Paulo, SP. 699 pp.

REINERT, H. K. Habitat variation within sympatric snake populations. **Ecology**, v. 65, p. 1673-1682, 1984.

REINERT, H. K.; CUNDALL, D. An improved surgical implantation method for radio-tracking snakes. **Copeia**, v. 1982, n. 3, p. 702-705, 1982.

REINERT, H. K.; ZAPPALORTI, R. T. Timber rattlesnakes (*Crotalus horridus*) of the Pine Barrens: Their movement patterns and habitat preference. **Copeia**, v. 1988, n. 4, p. 964-978, 1988.

SALOMÃO, M. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. The reproductive cycle in male neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). In: SCHUETT, G. W.; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. (Org.). **Biology of the Vipers**, Indiana: Carmel, 2002, p. 507-514.

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

SCHWARZKOPF, L.; ANDREWS, R. M. Are moms manipulative or just selfish? Evaluating the “maternal manipulation hypothesis” and implications for life-history studies of reptiles. **Herpetologica**, v. 68, P. 147–159, 2012a.

SCHWARZKOPF, L.; ANDREWS, R. M. “Selfish mothers” use “maternal manipulation” to maximise lifetime reproductive success. **Herpetologica**, v. 68, p. 308-311, 2012b.

SCHWARZKOPF, L.; SHINE, R. Thermal biology of reproduction in viviparous skinks, *Eulamprus tympanum*: why do gravid females bask more? **Oecologia**, v. 88, p. 562-569, 1991.

SCHUETT, G. W., R. S. REISERER, C. F. SMITH, AND M. J. FELDNER. 2017. **Rattlesnakes of Arizona**. Vol: 2, Eco Press: Rodeo, New Mexico, U.S.A.

SHINE, R. Costs of reproduction in reptiles. **Oecologia** (Berlin), v. 46, n. 1, p. 92-100, 1980.

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

SHINE, R. The evolution of viviparity in reptiles: an ecological analysis. In: GANS, C.; BILLET, F. **Biology of the Reptilia**, New York: John Wiley & Sons. 1985. p. 605-694.

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

SHINE, R. Manipulative mothers and selective forces: the effects of reproduction on thermoregulation in reptiles. **Herpetologica**, v. 68, p. 289-298, 2012.

SHINE, R.; HARLOW, P. S. Maternal manipulation of offspring phenotypes via nestsite selection in an oviparous lizard. **Ecology**, v. 77, p. 1808–1817, 1996.

SHINE, R.; MADSEN, T. R. L. Is thermoregulation unimportant for most reptiles? An example using water pythons (*Liasis fuscus*) in tropical Australia. **Physiological Zoology**, v. 69, p. 252-269, 1996.

SHINE, R.; MADSEN, T.R.L.; ELPHICK, M. J.; HARLOW, P. S. The influence of nest temperatures and maternal brooding on hatchling phenotypes of water Pythons. **Ecology**, v. 78, p. 1713–1721, 1997.

SLIP, D. J.; SHINE, R. Feeding habits of the diamond python, *Morelia s. spilota*: ambush predation by a boid snake. **Journal of Herpetology**, v. 22, n.3, p. 323-330, 1988.

SPEAKMAN, J. R. Thermoregulation in Vertebrates. In: WILEY, J; SONS. **Encyclopedia of life sciences**, p. 1-8, 2001.

STEVENSON, R. D.; PETERSON, C. R.; TSUJI, J. S. Thermal dependence of locomotion, tongue flicking, digestion, and oxygen consumption in the wandering gartersnake. **Physiological Zoology**, v. 58, p. 46-57, 1985.

TATTERSALL, G.J.; MILSOM, W.K.; ABE, A.S.; BRITO, S.P.; ANDRADE, D.V. The thermogenesis of digestion in rattlesnakes. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 579-585, 2004.

TATTERSALL, G. J.; LEITE, C. A. C.; SANDERS, C. E.; CADENA, V.; ANDRADE, D. V.; ABE, A.S.; MILSOM, W. K. Seasonal reproductive endothermy in tegu lizards. **Science Advance**, v. 2, 1500951, 2016.

TELEMECO, R. S.; ELPHICK, M. J.; SHINE, R. Nesting lizards (*Bassiana duperreyi*) compensate partly, but not completely, for climate change. **Ecology**, v. 90, p. 17-22, 2009.

TOZETTI, A. M.; MARTINS, M. Habitat use by the South-American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in south-eastern Brazil. **Journal of Natural History**, v. 42, ns. 19-20, p. 1435-1444, 2008.

TU, C. M.; HUTCHISON, V. H. Influence of pregnancy on thermoregulation of water snakes (*Nerodia rhombifera*). **Journal of Thermal Biology**, v. 19, p. 255-259, 1994.

ULLER, T.; WHILE, G. M.; CADBY, C. D.; HARTS, A.; O'CONNOR, K.; PEN, I.; WAPSTRA, E. Altitudinal divergence in maternal thermoregulatory behaviour may be driven by differences in selection on offspring survival in a viviparous lizard. **Evolution**, v. 65, n. 8, p. 2313-2324, 2011.

WEBB, J.K.; SHINE, R.; CHRISTIAN, K. A. The adaptive significance of reptilian viviparity in the tropics: testing the maternal manipulation hypothesis. **Evolution**, v. 60, p. 115–122, 2006.