LIGIA GRAZZIELY DOS SANTOS AMORIM

Atividade reprodutiva de *Bothrops insularis*: investigando a intersexualidade

São Paulo

2021

LIGIA GRAZZIELY DOS SANTOS AMORIM

Atividade reprodutiva de *Bothrops insularis*: investigando a intersexualidade

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

Orientador:

Prof. Dra. Selma Maria de Almeida Santos

São Paulo

2021

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. 4090
FMVZ

Amorim, Ligia Grazziely dos Santos
Atividade reprodutiva de *Bothrops insularis*: investigando a intersexualidade / Ligia Grazziely dos Santos Amorim. – 2021.
58 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2021.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

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

1. Reprodução. 2. Serpentes. 3. Estratégias reprodutivas. 4. Intersexo. 5. Hemipênis. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Atividade reprodutiva de Bothrops insularis: Investigando a intersexualidade in situ", protocolada sob o CEUA nº 8732220119 (ID 006229), sob a responsabilidade de **Selma Maria de Almeida Santos** *e equipe; Ligia Grazziely dos Santos Amorim* - 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 07/03/2019.

We certify that the proposal "Male and female activity reproductive of Bothrops insularis: investigating intersexuality in situ", utilizing 200 Reptiles (males and females), protocol number CEUA 8732220119 (ID 006229), under the responsibility of **Selma Maria de Almeida Santos** *and team; Ligia Grazziely dos Santos Amorim* - 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 03/07/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 03/2019 a 02/2021 Área: Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres

Origem:	Instituto Butantan						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	0 a 20 anos	N:	200
Linhagem:	Bothrops insularis			Peso:	0 a 3000 g		

Local do experimento: Ilha da Queimada Grande

São Paulo, 27 de novembro de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: AMORIM, Ligia Grazziely dos Santos

Título: **Atividade reprodutiva de *Bothrops insularis*:** investigando a intersexualidade

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

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu amado filho, Manoel Amorim Viudes de Abreu.

AGRADECIMENTOS

A minha família, por todo apoio, amor e carinho. Meu pai Paulo, minha mãe Gláucia, meus irmãos, Tamires, Matheus, Isaac e Kalil, por simplesmente existirem.

À Selma Maria de Almeida Santos pela orientação (desde que eu era bem pequenininha), aprendizados e por todas as oportunidades, minha eterna gratidão.

A minha querida e amada amiga Valquiria de Oliveira, por simplesmente TUDO. Pela paciência, pela amizade, pelas longas horas no telefone, pelos cafés, pelo teto, pelas noites mal dormidas, pelas visitas, por sempre levantar meu astral e me incentivar em todas minhas escolhas (quase todas...rs). Você foi peça fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Minha dívida vai se estender por algumas vidas. Muito obrigada com todo o meu coração. Você sempre será minha eterna duplinha.

Ao meu amigo irmão, Fabiano Morezi de Andrade, por percorrer todo o caminho desde o PAP ao meu lado, onde nasceu uma grande amizade, respeito e muito amor. Obrigada por embarcar nas minhas loucuras sempre muito disposto, pelas trilhas, pela companhia nos tempos de CRUSP, por sempre fornecer seu ombro amigo nos momentos que eu mais precisei. Gratidão eterna por Deus te colocar na minha vida.

Ao meu querido amigo e coorientador Marcelo Duarte, por todos os ensinamentos, por todos os cafezinhos e conversas em sua sala, por fornecer seus preciosos dados que por sinal sem ele, esse trabalho não existiria. Minha eterna gratidão por tudo! Você estará sempre em meu coração.

A Andressa Barreto, amiga que o PAP me deu e que levarei por toda a vida, por todos os momentos que passamos juntas, por ser sempre tão doce e me apoiar sempre.

As minhas amigas Vanessa e Vanuza (super gêmeas), por resolver todos os problemas em surf, pizza e cerveja!

Ao meu parceiro, responsável pelo presente mais lindo que a vida me deu (nosso filho Manoel), por sempre puxar minha orelha e me incentivar a crescer e lutar pelos meus objetivos, que por mais que seja enérgico, sempre me impulsionou para frente. Sou grata por tudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela formação e toda a oportunidade de crescimento nos últimos anos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Processo nº 88882.327848/2019-01.

Ao Instituto Butantan por todo conhecimento, suporte e infraestrutura.

Ao Laboratório de Ecologia e Evolução – LEEV e ao Museu Biológico do Instituto Butantan pelo fornecimento dos espécimes para estudo deste trabalho.

Ao Otavio Marques, que há muito tem minha admiração! Obrigada por todos os ensinamentos e por abraçar nossas ideias em prol da educação ambiental.

A todos do laboratório, a Poly, Adriano Fellone, Andressa Barreto, Diego Mota, Kelly Kishi (Kelly Kee, por cuidar da minha pupila e de meus netinhos), Kalena Barros, Rafaela Coeti, Rebeca Khouri, Serena Migliore, Tatiane Lima, pela amizade, pelos ensinamentos e diversão nos últimos anos. Também muito agradecido ao Bruno Costa, Cibele Barbarini, Cintia Fugiwara, Dani Amorim, Eletra de Souza, Éliton Vieira, Erick Bassi, Esther Salgado, Gabizinha, Karina Banci, Lucas Henrique, Myriam Calleffo, Natalia Vieira, Rafaella Jurkfitz, Silara Batista por todo o tempo que compartilhamos.

Aos demais colegas do Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan. Cristiene Martins, Darina, Dona Maria, Marta, Regina e Dona Vera. Muito obrigado a todos.

A Veterinária Viviane Garcia, por fazer todo o acompanhamento gestacional da minha pupila, que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho. Aprendi muito com você. Muito obrigada.

Ao Laboratório Especial de Coleções Zoológicas – LECZ pela preparação de estruturas de espécimes deste trabalho.

Ao Weverton Azevedo, pela amizade, pelas fotos na super macro, por todas a considerações, pelas caipirinhas e longas conversas sobre a origem do universo.

Ao Arthur Abegg, pela amizade, pelos “pedaL”, e por sempre me lembrar que devo cortar os carboidratos. Muito obrigada por tudo!

Ao Centro de Estudos de Animais Peçonhentos – CEVAP pela oportunidade de ter avaliados os espécimes em cativeiro.

Ao ICMBio não somente por toda a infraestrutura e apoio em todas as expedições, mas por ser o início de tudo, desde minha introdução na herpetologia até minha formação acadêmica.

Ao Carlos Renato de Azevedo, antigo chefe da ARIE, que sempre me incentivou a seguir com os estudos. Agradeço pela amizade e toda a trajetória que seguimos juntos na Queimadona. Meus mais sinceros muito obrigada!

A Adriana Melo Magalhães, analista ambiental, que sempre me apoiou em tudo, sempre muito doce e amável.

Ao Marcelo de Madeiros, piloto de embarcação, pela amizade e nos conduzir até a ilha 90% das expedições. Aprendi muito com você!

Ao Carlos Roberto Abrahão (Feliz), meu primeiro orientador na área acadêmica, que tenho grande respeito, admiração e gratidão, por todos os ensinamentos, amizade e por lembrar que haja o que houver, a culpa é sempre minha (rsrs)!

A toda equipe da ARIE, Eduardo, Cássio, Marianna (com 2 n), e também aos vigilantes!

A Equipe da Fundação Florestal, e em especial meu amigo do coração, Alexandre Vechi, por alegrar todas as expedições, deixando tudo mais leve com seu jeito único de ser! Fez toda a diferença!

A todos que diretamente ou indiretamente participaram deste trabalho! Muito obrigada!

“Aquele que for capaz de perder uma corrida sem culpar os outros pela sua derrota tem grande possibilidade de algum dia ser bem sucedido (Napoleon Hill).”

RESUMO

AMORIM, L. G. S. **Atividade reprodutiva de *Bothrops insularis*:** investigando a intersexualidade. 2021. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Bothrops insularis é uma espécie criticamente ameaçada de extinção e endêmica da Ilha da Queimada Grande (IQG) – SP, localizada a cerca de 34 km da costa de São Paulo. O ciclo reprodutivo é considerado sazonal e suas estratégias reprodutivas são semelhantes às da espécie continental. O objetivo desse estudo foi registrar e analisar os hábitos reprodutivos e comportamentais de Bothrops insularis, com ênfase na intersexualidade. Foram realizadas cinco expedições à IQG nos anos de 2019 e 2020. A trilha de 1.670m foi percorrida parcialmente por meio de procura visual limitada por tempo, abrangendo todos os habitats. Adicionalmente, foram analisados 30 indivíduos de B. insularis em cativeiro, dos laboratórios do Instituto Butantan e do CEVAP (UNESP Botucatu). Dados de coleta entre 1995 a 2006, referente a 30 expedições realizadas à IQG foram compilados para comparação da atividade reprodutiva. Os dados foram tratados com o programa de estatística *Statistical Analyses Systems*. Previamente à análise foi verificada a normalidade dos resíduos através do teste de Shapiro-Wilk. No presente trabalho foi possível observar a existência de dois morfotipos, fêmeas sem hemiclítoris e intersexos, sendo que os indivíduos intersexos apresentaram maior atividade ao longo das estações, com maior pico no período reprodutivo. A proporção sexual de indivíduos intersexuados aumentou ao longo dos anos, diminuindo a frequência de machos, bem como de fêmeas sem hemiclitóris. Um espécime foi coletado em setembro de 2019 para acompanhamento mensal de seu estágio reprodutivo, pois tratava-se de uma fêmea que não apresentava o hemiclítoris, cujos encontros são mais raros. Análise das fêmeas intersexuadas evidenciou que o tamanho dos hemiclitóris são bem próximos dos hemipênis dos machos. Sugerimos que o monitoramento da espécie in situ seja primordial para que se compreenda melhor suas estratégias reprodutivas, visando contribuir com sua conservação.

Palavras-chave: Reprodução. Serpentes. Intersexo. Estratégias reprodutivas. Hemipênis.

ABSTRACT

AMORIM, L. G. S. **Reproductive activity of *Bothrops insularis*:** investigating intersexuality. 2021. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Bothrops insularis is a critically endangered species from Ilha da Queimada Grande (IQG) – SP, located about 34 km off the coast of São Paulo. The reproductive cycle is considered seasonal and its reproductive strategies are similar to those of the continental species. The object of this research is to register and analyze the reprodutive and behavioral habits of *Bothrops insularis*, with an emphasis on intersexuality. Five expeditions were carried out to IQG between 2019 and 2020. The 1.670m trail was partially covered through time-limited visual search, comprehending all habitats. Additionally, 30 individuals of *B. insularis* in captivity, from Instituto Butantan and CEVAP (UNESP Botucatu) laboratories were analyzed. Data collected from 1995 to 2006, referring to 30 expeditions made to IQG were compiled for comparison of reproductive activity. This material was dealt with the *Statistical Analysis System*. Prior to the analysis, the normality of the residues was verified using the Shapiro-Wilk test. In the present work, it was possible to observe the existence of two morphotypes, females without hemiclitoris and intersex, and intersex individuals showed greater activity throughout the seasons, with a greater peak in the reproductive period. The sex ratio of intersex gaps increased over the years, decreasing the frequency of males, as well as abstinence without hemiclitoris. One specimen was collected in September 2019 for monthly monitoring of its reproductive stage, as it was a female that did not have the hemiclitoris, whose encounters are rarer. Analysis of intersex females showed that the size of the hemiclitoris is very close to the hemipenis of males. We suggest species in situ monitoring to be essential to better understand its reproductive strategies, aiming to its conservation.

Keywords: Reproduction. Snakes. Intersex. Reproductive strategies. Intersex. Hemipenis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilha da Queimada Grande (IQG) 19
Figura 2 - *Bothrops insularis* (jararaca-ilhoa) na Ilha da Queimada Grande.....21
Figura 3 - Hemiclitóris de intersexo de *B. insularis* 23
Figura 4 - Proporção sexual (número de machos, fêmeas e intersexos) de *B. insularis* em diferentes períodos 25
Figura 5 - Transecto parcialmente percorrido na Ilha da Queimada Grande, variando de 386m (desembarque/costa até o farol) a 1670m (cruza a ilha de norte a sul) . 27
Figura 6 – Sexagem de *B. insularis* 28
Figura 7 - Coleta de dados biométricos *in situ* 29
Figura 8 - Analise sexual de animais que foram a óbito 28
Figura 9 - Ultrassonografia em fêmea de *B. insularis* 31
Figura 10 - Aferição de dados da fêmea "verdadeira" (chip 9630008000237152) coletada na Ilha da Queimada Grande em 15 de setembro de 2019 33
Figura 11 - Exames de ultrassom de *B. insularis*; (A e B) Folículo em vitelogênese secundária, com 1,77 cm e 3,29 cm de comprimento (realizada em novembro de 2019); (C) Ovo medindo 4,07 cm (realizada em dezembro de 2019); (D) Embrião de *Bothrops insularis* (realizada em janeiro de 2020) 34
Figura 12 - Exame radiográfico de *B. insularis* onde foi observada estruturas ovóides (realizada em janeiro de 2020) 34
Figura 13 - Último exame de ultrassom de *B. insularis*, realizado em 17 de fevereiro de 2020..... 35
Figura 14 - Filhotes nascidos da fêmea verdadeira em 18 de maio de 2020 36
Figura 15 - Hemiclitóris de *Bothrops insularis*. (A) Vista do lado assulcado e (B) sulcado. (C) Eversão do hemiclitóris na cauda. Barra de escala vertical: 2 mm ... 37
Figura 16 - Espécimes analisados: (16A) Fêmea sem a presença de hemiclitóris ou músculos retratores; (16B) Fêmea com hemiclitóris direito 38
Figura 17 - Tecido evertido do espécime IBSP89912, reforçando a inexistência de hemiclitóris 39
Figura 18 - (18A) Casal de *B. insularis* no período reprodutivo; (18B) Cloaca avolumada, indicando possível evento de corte ou pós cópula (registro realizado no mês de junho); (18C) Fêmeas de *B. insularis* sobre a vegetação durante o período reprodutivo; (18 E e F) Registro de cópula no solo) 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comprimento rostro-cloacal (CRC), Comprimento caudal (CC) e massa dos filhotes de *B. insularis* (chip 9630008000237152) nascidos em cativeiro no LEEV oriundos de acompanhamento gestacional 35
Tabela 2 - Dados biométricos de animais pertencentes ao plantel do Museu Biológico do Instituto Butantan 38
Tabela 3 - Porcentagem (%) e número (observado/total) de indivíduos encontrados de cada sexo ao longo das estações do ano 41
Tabela 4 - Média ± erro padrão da média do tamanho do hemipênis/hemiclitóris direito de machos e intersexos ao longo das estações do ano 42
Tabela 5 - Média ± erro padrão da média do tamanho do hemipênis/hemiclitóris esquerdo de machos e intersexos ao longo das estações do ano 43
Tabela 6 - Porcentagem (%) e número (observado/total) de indivíduos encontrados de cada sexo ao longo das estações do ano 46
Tabela 7 - Média ± erro padrão da altura em relação ao solo em que os animais foram encontrados, baseado em seu sexo 47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Temperatura corpórea superficial de espécimes do plantel de *B. insularis*, comparada com a temperatura do ar durante toda a gestação.....36
Gráfico 2 - Número de indivíduos por sexo de *B. insularis* observados de 1995 a 2006 durante as estações.....40
Gráfico 3 - Proporção sexual de *B. insularis* (Adaptado de Hoge et al., 1959) 40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 Ilha da Queimada Grande 18
1.2 Jararaca-Ilhoa 20
1.3 Justificativa 25
2 OBJETIVOS 26
3 MATERIAIS E MÉTODOS 27
3.1 Coleta de dados *in situ* 27
3.2 Coleta de dados *ex situ* 29
3.3 Exames ultrassonográficos 30
3.4 Dados de terceiros 31
3.5 Análises estatísticas 31
4 RESULTADOS 32
4.1 Dados *in situ* 32
4.2 Exames ultrassonográficos da fêmea verdadeira (chip 9630008000237152) 33
4.3 Parturição 35
4.4 Temperatura média corpórea superficial de espécimes do plantel de *B. insularis* do Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV) durante o período gestacional da fêmea verdadeira (chip 9630008000237152) 37
4.5 Plantel do Museu Biológico do Instituto Butantan (MBIB) 38
4.6 Dados de terceiros dos órgãos copulatórios *in situ* 40
4.7 Análises estatísticas 41
4.7.1 Número de indivíduos encontrados 41
4.7.2 Tamanho do hemipênis direito 42
4.7.3. Tamanho do hemipênis esquerdo 42
4.7.4. Microhabitat no local de Encontro - Atividades de machos, fêmeas sem hemiclitóris e intersexos *in situ* 43
5 DISCUSSÃO 48
6 CONCLUSÕES 51
REFERÊNCIAS 52

1 INTRODUÇÃO

O grupo das serpentes é um dos maiores e mais diversos dentre os répteis, apresentando diferentes graus de especialização além de ocupar uma grande diversidade de habitats. Ocuparam praticamente todos os ambientes disponíveis, desde terrestres, subterrâneos e arbóreos, até as águas continentais e oceânicas, diversificando-se notavelmente para se adaptar a exigências tão diversas (MELGAREJO, 2002; ROCHA-BARBOSA et al., 2015).

As serpentes desenvolveram estratégias reprodutivas extremamente variáveis ao longo do tempo (SHINE, 2003). Ainda há muito a se descobrir sobre a biologia reprodutiva desses animais e o quanto essa etapa vital pode ser influenciada e estendida por fatores internos (fisiologia) e externos, como o ambiente em que o animal ocorre. A biologia reprodutiva compreende uma série de fatores que envolvem a história de vida, comportamentos e processos fisiológicos, sendo o fator mais abordado em estudos de história natural de serpentes (SHINE, 2003).

Estudos sobre reprodução são essenciais para a compreensão da biologia das espécies (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004) e para propor medidas de conservação. A magnitude do custo energético e sua relação com o ciclo reprodutivo diferem fundamentalmente entre machos e fêmeas (AUBRET et al., 2004). Contudo, a conservação e a restauração da fauna selvagem devem acontecer concomitantemente com a preservação do habitat natural, para que a fauna em risco consiga futuramente obter seus próprios recursos e assegurar sua sobrevivência (CULLEN JR; RUDRAN; VALLADARES-PÁDUA, 2003).

Como todos os amniota, os répteis apresentam fecundação interna e, com exceção dos tuataras, que são desprovidos de órgão copulador, os machos deste grupo apresentam um órgão copulatório denominado hemipênis (VITT; CALDWELL, 2013). Enquanto a grande maioria das espécies de répteis é ovípara, algumas outras, principalmente as relacionadas aos ambientes aquáticos tendem a ser vivíparas (LEMA 2002, CARREIRA; MANEYRO, 2013).

Outra condição conhecida para répteis é a intersexualidade, definida como uma condição em que estruturas reprodutivas em um determinado sexo também são encontradas no sexo oposto (GOLDSCHMIDT, 1917). Esta condição pode incluir tanto o hermafroditismo (presença de tecidos ovarianos e testiculares) como o pseudo-hemafroditismo (presença de tecido gonadal de um único sexo). Um indivíduo é

considerado como intersexo quando possui estruturas que são características do sexo oposto, ou seja, machos com características anatômicas de fêmeas e vice-versa (FORBES, 1964).

Em répteis Squamata, casos de intersexualidade são amplamente relatados em lagartos (BÖHME 1995; ZIEGLER; BÖHME, 1997; TELEMECO, 2015, VALDECANTOS; LOBO, 2015), anfisbenas (KASPEROVICZUS et al., 2011) e serpentes (HOGE et al., 1959; HARDY, 1970; ZIEGLER; BÖHME, 1997). A condição intersexual nestes grupos é geralmente evidenciada em fêmeas que apresentam um órgão equivalente ao hemipênis, geralmente menores e denominados hemiclitóris (BÖHME, 1995). Assim, todas estas características reprodutivas, tanto para machos como para as fêmeas, são necessárias para um completo entendimento do ciclo de qualquer espécie (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004).

1.1 Ilha da Queimada Grande

Ambientes insulares são, sem dúvida, uma das fontes mais importantes para estudos evolutivos, além de possuir em sua fauna, flora e aspectos geomorfológicos, indícios dos eventos geológicos e climáticos ocorridos em tempos pretéritos. Os dados obtidos em pesquisas realizadas em ilhas permitem traçar estimativas acerca de diversos aspectos biológicos e geológicos ocorridos, além de favorecer o planejamento de estratégias conservacionistas adequadas à dinâmica dos ambientes insulares (ZELANIS, 2006; SALLES et al., 2020).

A formação das ilhas litorâneas brasileiras fornece evidências para o surgimento de casos de endemismo ao isolar algumas espécies. Com o derretimento das calotas de gelo, houve um aumento no nível do mar, submergindo regiões continentais e originando diversas ilhas (WÜSTER et al., 2005). Assim como ocorreu em outras ilhas do litoral Sul e Sudeste brasileiro, estima-se que a Ilha da Queimada Grande tenha sido separada do continente no final do Pleistoceno, há 11.000 anos, no fim da última glaciação, quando o derretimento das calotas de gelo continentais ocasionou transgressões oceânicas e provocou a submersão de porções continentais (MARQUES, 2013).

A Ilha da Queimada Grande (Figura 1) está localizada a cerca de 34 Km da costa de São Paulo (24°29’S e 46°41’W). Esta ilha foi classificada como uma Área de Relevante Interesse Ecológico - ARIE, Unidade de Conservação Federal de Uso

Sustentável, pelo Decreto nº 91.887 de 05/11/1985. Possui cerca de 1.500 m de comprimento, 500 m de largura, altitude máxima de 200 m e uma área de 430.000 m2, é coberta por Mata Atlântica, áreas rochosas e gramíneas, não há praias arenosas nem fonte de água doce (MARQUES et al., 2002; AMORIM et al., 2019).

No final do século XIX, a Marinha do Brasil implantou um farol na ilha cuja manutenção era realizada por faroleiros que residiam no local. Com medo das serpentes, a própria Marinha do Brasil colocou por diversas vezes fogo na mata da ilha na tentativa de acabar com a população excessiva. Os faroleiros habitaram a ilha até 1925 quando foram retirados e o farol automatizado (KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2012). Uma área coberta por vegetação gramínea de aproximadamente 0,025 km² onde incêndios e desmatamentos ocorridos no passado encontra-se atualmente em recuperação e deve eventualmente ser coberto por floresta tropical (MAGALHÃES, 2015).

Figura 1 - Ilha da Queimada Grande (IQG).
Foto: Arquivo ICMBio.

É inteiramente inacessível pelo mar quando está revolto, sendo a costa rochosa e escarpada de difícil acesso, encontrando-se água doce somente de duas fontes calcárias, inviáveis para o consumo humano (AMARAL, 1927). O clima é tropical úmido, com temperaturas médias acima dos 22ºC nos meses mais quentes e abaixo dos 18ºC nos mais frios (BOVO et al., 2012). A fauna local é composta por 68

espécies de aves - entre residentes e migratórias – duas espécies de morcegos, duas espécies de anfíbios, três espécies de lagartos, duas espécies de anfisbenídeos e duas espécies de serpente, sendo uma delas a jararaca-ilhoa. Não existem mamíferos terrestres na ilha (MACARRÃO, 2010).

A Ilha da Queimada Grande, bem como outras ilhas paulistas, são exemplos de ambientes que vêm sendo constantemente alvos de estudos herpetofaunísticos que têm contribuído significativamente na elaboração de medidas conservacionistas, com efeito para os ambientes insulares de uma forma geral (AMORIM et al., 2019).

1.2 Jararaca-Ilhoa

O gênero *Bothrops* possui atualmente 28 espécies válidas no Brasil (COSTA; BÉRNILS, 2018). Quatro delas são endêmicas de ilhas costeiras localizadas na região sudeste do país: uma no estado do Espírito Santo *Bothrops sazimai* Barbo, Gasparini, Almeida, Zaher, Grazziotin, Gusmão, Ferrarini e Sawaya, 2016 da Ilha dos Franceses, e três da costa paulista: *Bothrops alcatraz* Marques, Martins e Sazima, 2002 da Ilha dos Alcatrazes, *Bothrops otavioi* Barbo, Grazziotin, Sazima, Martins e Sawaya, 2012 da Ilha da Vitória e *Bothrops insularis* (AMARAL, 1921) da Ilha da Queimada Grande (GRAZZIOTIN et al., 2006; COSTA; BÉRNILS, 2018).

B. insularis (Figura 2), conhecida popularmente como jararaca-ilhoa, descrita em 1921 por Afrânio do Amaral (AMARAL, 1921), é uma serpente endêmica da Ilha da Queimada Grande - SP (IQG), atualmente categorizada como criticamente em perigo de extinção (IUCN, 2016). Os primeiros exemplares de jararaca-ilhoa chegaram ao Instituto Butantan em 1911, enviados pelo então faroleiro da ilha da Queimada Grande (KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2012). Inicialmente foi descrita como *Lachesis lanceolatus* (atualmente *B. jararaca*), mas alguns anos depois, o pesquisador da extinta “Secção de Ophiologia”, Afrânio do Amaral, em visita a ilha percebeu se tratar de uma espécie diferente da jararaca do continente e então classificou como *Lachesis insularis* (AMARAL, 1921) e posteriormente em *B. insularis* (AMARAL, 1929).

Figura 2 - *Bothrops insularis* (jararaca-ilhoa) na Ilha da Queimada Grande.

Filogeneticamente, *B. insularis* pertence ao Grupo Jararaca que compreende outras duas espécies: *B. jararaca* e *B. alcatraz*, esta última endêmica da Ilha de Alcatrazes, Litoral Norte de São Paulo (MARQUES et al., 2002). Acredita-se que *B. insularis* e *B. alcatraz* tiveram um mesmo ancestral comum, muito semelhante a *B. jararaca*, e que, após os fenômenos climáticos ocorridos no final do Pleistoceno e o consequente isolamento geográfico, estas serpentes divergiram como novas espécies (MARQUES et al., 2002; WÜSTER et al., 2005).

Apesar de pertencer ao mesmo grupo da jararaca do continente, a jararaca-ilhoa ainda guarda algumas particularidades em sua biologia, como a dieta na fase adulta constituída basicamente por aves (MARTINS et al., 2002), o hábito arborícola e diurno (AMARAL, 1921, 1927) e a ação diferenciada de seu veneno (ZELANIS et al., 2008). Morfologicamente também possui características particulares, como sua coloração pardo-amarelada e o corpo comprimido lateralmente com cauda ligeiramente preênsil, sendo estas duas últimas características comumente encontradas em serpentes arborícolas (AMARAL, 1921, 1927; MARTINS et al., 2001).

Martins et al. (2001) a descreve como sendo diurna, semi-arborícola, e com alimentação predominantemente composta por aves migratórias durante a vida adulta, diferentemente da jararaca do continente, que tem hábito noturno e alimentação generalista (composta por mamíferos, aves, anfíbios e lagartos). A dieta de indivíduos

jovens é composta de animais ectotérmicos, como artrópodes, anfíbios e lagartos (MARQUES; MARTINS; SAZIMA, 2002), e a ação do veneno de *B. insularis* apresenta especificidade para as presas locais (ZELANIS; TRAVAGLIA-CARDOSO; FURTADO, 2010). A jararaca- ilhoa parece se alimentar com mais frequência no final da estação chuvosa (fevereiro e março) e no final da estação seca (agosto e setembro), quando acontecem os picos migratórios de *Elaenia chilensis* itálico e *Turdus flavipes* itálico, respectivamente (MACARRÃO, 2010).

O ciclo reprodutivo dessa espécie é considerado sazonal e suas estratégias reprodutivas são semelhantes às da espécie continental, *B. jararaca*. Nos machos de *B. insularis* o início da espermatogênese é no outono (KASPEROVICZUS, 2009). Nas fêmeas, a vitelogênese ocorre no outono e inverno (entre março e julho) (MARQUES et al., 2013), paralelamente ao período de acasalamento. Já a ovulação e fertilização ocorrem na primavera, com nascimento dos filhotes no final do verão e início do outono (JANEIRO-CINQUINI et al., 1993; ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; ALMEIDA-SANTOS, 2005; MARQUES et al., 2013).

A ninhada de *B. insularis* raramente ultrapassa dez filhotes, enquanto a jararaca do continente pode chegar a trinta (MARQUES et al., 2002; KASPEROVICZUS, 2009; MARQUES et al., 2013). Além de ninhadas diminutas quando comparada as ninhadas de *B. jararaca*, por exemplo, a *B. insularis* possui elevado número de ovos atrésicos, sem formação do embrião (MARQUES et al., 2013). A atresia é um processo de morte celular ou apoptose da maioria dos folículos ovarianos, conhecido por uma variedade de condições morfológicas ou patológicas. A lipoperoxidação induz ao dano tecidual, relacionado à patogênese de distintas doenças que podem levar à morte celular (CORREA, 2019). Em cativeiro, as fêmeas de Squamata podem ter uma maior incidência de ovos inférteis, tanto em espécies ovíparas quanto vivíparas (RONNE, 1996). A disponibilidade de recurso é um dos fatores importantes para frequência reprodutiva, sendo essa disponibilidade provavelmente menor na ilha, pela variação anual do número de aves migratórias. Isto pode ocasionar baixa taxa de natalidade (MARQUES et al., 2013).

Segundo ZELANIS (2006), o veneno de *B. insularis* é mais específico frente à oferta de uma dieta especializada. Sugere-se que há peculiaridade na composição do veneno que favorece a dieta especializada no seu habitat insular, e mesmo havendo mudança ontogenética na dieta, a toxicidade do veneno para presas locais é uma característica presente durante toda a vida desta espécie (ZELANIS et al., 2008).

Na Ilha existem machos, fêmeas e indivíduos denominados intersexos, que são fêmeas genéticas e funcionais, porém apresentam um hemipênis rudimentar, denominado hemiclitóris (Figura 3) que não está associado a gônadas masculinas e, portanto, não é funcional (HOGE et al., 1959). Alguns parâmetros biométricos como tamanho e ganho de massa durante o desenvolvimento são similares às fêmeas e aos intersexos e diferem em relação aos indivíduos machos, fato também observado em outras espécies de *Bothrops* continentais, como *B. jararaca*, por exemplo. (TRAVAGLIA-CARDOSO, 2000).

Figura 3 - Hemiclitóris de intersexo de *B. insularis*.
Foto: Airton Lourenço.

Em expedição à Ilha da Queimada Grande Hoge et al. (1959) coletaram um exemplar hermafrodita, apresentando ambos os hemipênis bem desenvolvidos, um testículo do lado direito e ambos ovários. Outra característica importante verificada durante essa expedição foi que todos os exemplares prenhes que foram coletados eram intersexos, afirmando que as “fêmeas verdadeiras” eram estéreis (HOGE et al., 1959). As hipóteses mais plausíveis para o aparecimento dos intersexos são: (a) mutações eventuais que levaram ao aparecimento do fenótipo intersexo ou (b)

consequências de cruzamentos consanguíneos (*Inbreeding*) na população de *B. insularis* (HOGE et al.,1959; BEÇAK et al.,1990). Em estudos de citogenética, Beçak et al. (1990) propuseram alguns mecanismos genéticos para explicar o aparecimento dos intersexos na população de *B. insularis.*

Na maioria das serpentes a determinação do sexo é genotípica e, ao contrário dos mamíferos, a fêmea é o sexo heterogamético (ZW) e o macho homogamético (ZZ) (RAYNAUD; PIEAU, 1985; POUGH et al.,1998). Os intersexos presentes na população de *B. insularis* são heterogaméticos (ZW) e apresentam um polimorfismo no cromossomo W, que teria sido formado por translocações seguidas por outras alterações cromossômicas, como trocas desiguais de cromátides irmãs durante o *crossing over* (BEÇAK et al.,1990). Essas mudanças podem ter envolvido o(s) gene(s) que normalmente inibe(m) o desenvolvimento do hemipênis em embriões femininos, e desta forma uma repressão no gene anti-hemipênis levaria ao aparecimento de um hemipênis rudimentar nas fêmeas denominadas intersexos (BEÇAK et al.,1990).

Hoge et al. (1959) realizaram um estudo populacional na ilha onde foi determinada a proporção de machos, fêmeas e indivíduos intersexos (Figura 4). O estudo baseou-se em duas amostras num intervalo de aproximadamente 25 anos entre ambas. Os resultados desse estudo mostraram uma mudança na proporção dos sexos durante esse período, com uma redução do número de machos, aumento do número de indivíduos intersexos e frequência estacionária das fêmeas “verdadeiras” (Figura 3). Recentemente alguns estudos têm demonstrado apenas a existência de fêmeas intersexos e machos (KASPEROVICZUS, 2009).

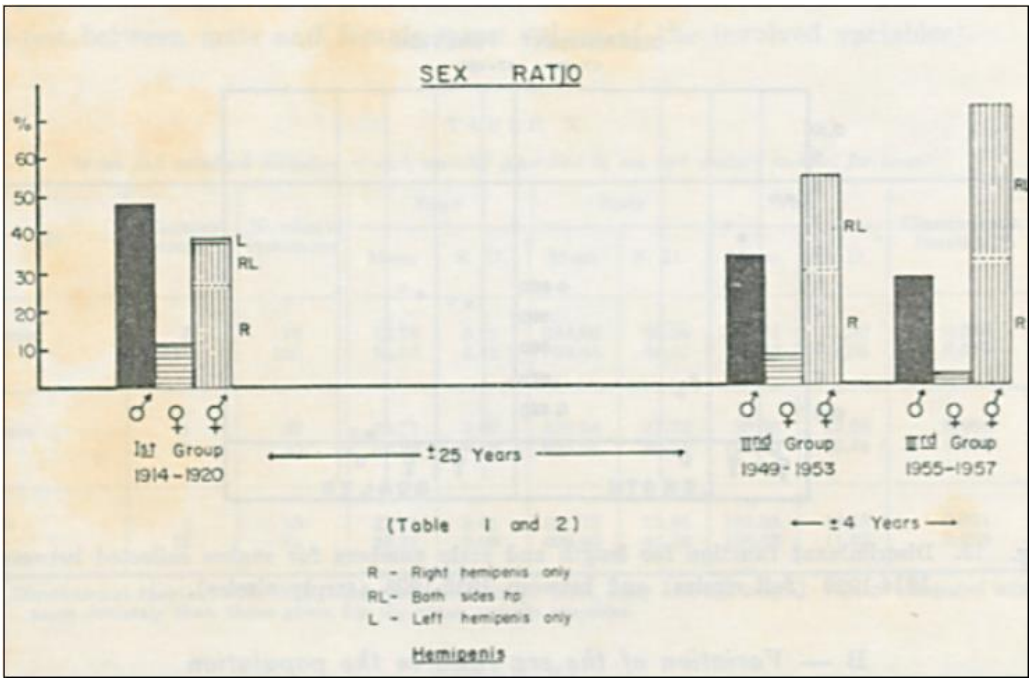


Figura 4 - Proporção sexual (número de machos, fêmeas e intersexos) de *B. insularis* em diferentes períodos.
Fonte: (HOGE et al., 1959)

Devido ao endemismo e à diminuição da qualidade de habitat por impacto antrópico, medidas conservacionistas são imprescindíveis a fim de evitar o desaparecimento dessa espécie. Apesar dos esforços em campo até aqui realizados, bem como os trabalhos e dados levantados com espécimes depositados em coleções zoológicas, ainda se conhece muito pouco a respeito da biologia reprodutiva de *B. insularis* (MARQUES et al., 2013; AMORIM et al., 2019; SALLES-OLIVEIRA et al., 2020). Além disso, as interrelações entre fatores como: época de alimentação e período reprodutivo vinculados a atividades sazonais de machos, fêmeas e intersexos são muito conflitantes. Dessa forma, esse estudo pretende contribuir para o conhecimento da atividade reprodutiva *in situ* da população atual na ilha da Queimada Grande, promovendo subsídios para a reprodução "*ex situ*" desta espécie e consequentemente a sua preservação.

1.3 Justificativa

Desde o início dos estudos da biologia evolutiva, as ilhas desempenharam um papel importante na formulação e no teste das teorias evolutivas (WÜSTER et al., 2005). Ilhas possuem flora e fauna reduzidas o que propicia entender a evolução, as

modificações adaptativas deste ambiente, além de observação das radiações adaptativas com interações complexas nas colonizações, imigração e extinção de espécies.

Um benefício das ilhas recentemente isoladas é que as espécies encontradas nelas provavelmente são intimamente relacionadas diretamente aos descendentes do continente (WÜSTER et al., 2005), como é o caso da Ilha da Queimada Grande. A amostragem de indivíduos em campo é necessária para obter informações como riqueza e abundância relativa das espécies, utilização do habitat (substrato de forrageio, repouso, termorregulação, etc.), reprodução, atividade diária e sazonal, dentre outras (BERNARDE, 2012).

B. insularis é uma espécie presente na lista oficial de animais ameaçados de extinção, devido sua distribuição restrita (MARQUES et al., 1998; MARQUES et al., 2002; MACHADO et al., 2008), a estimativa populacional é de 2000-4000 indivíduos por toda ilha (MARTINS, 2008; ABRAHÃO et al., 2021). Portanto, é importante analisar os hábitos e comportamentos desses animais para o sucesso da reprodução *ex situ* e possível reintrodução à natureza como estratégias futuras de conservação.

Diante da escassez de estudos reprodutivos quando se trata de espécies insulares, como é o caso de *B. insularis*, é de suma importância o desenvolvimento de trabalhos que investiguem o processo reprodutivo desta espécie, pois trata-se de uma espécie criticamente ameaçada de extinção, havendo muitas lacunas ainda presentes de como ocorreu a evolução do padrão reprodutivo desta espécie.

2 OBJETIVOS

- Estudar e registrar comportamento reprodutivos de *Bothrops insularis in situ e ex situ;*
- Comparar atividade de machos, fêmeas e intersexos, no período reprodutivo *in situ*;
- Investigar o papel do hemiclitóris dos indivíduos intersexos *in situ e ex situ*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de dados *in situ*

Foram realizadas cinco expedições para a Ilha da Queimada Grande (IQG) no ano de 2019, referente aos meses de fevereiro, junho, agosto e setembro, todas com duração de um dia. Em 2020, foi realizada uma expedição de 14 a 16 de março. A equipe foi composta por 4 a 6 observadores, sendo biólogos e veterinários de diferentes instituições (Instituto Butantan, USP, ICMBio- IQG). A única trilha existente de 1.670m (que cruza do norte ao sul da ilha), foi percorrida parcialmente (Figura 5) por meio de Procura Visual Limitada por Tempo (PLT), que consiste no lento deslocamento a pé pelos transectos à procura dos indivíduos que estejam visualmente expostos, abrangendo todos os habitats visualmente acessíveis. Nesse método é possível coletar informações mais precisas sobre a atividade do animal e sua localização no habitat (MARTINS; OLIVEIRA, 1998). De acordo com as licenças fornecidas (SISBIO nº 26650-3), estabeleceu-se o transecto com 16m de largura e comprimento~~s~~ entre 386 a 1670m.

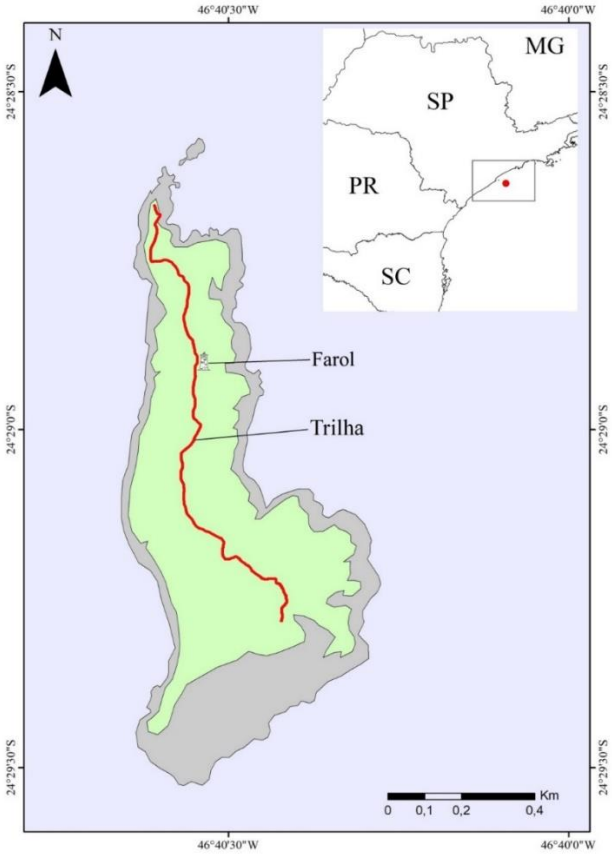


Figura 5 - Transecto parcialmente percorrido na Ilha da Queimada Grande, variando de 386m (desembarque/costa até o farol) a 1670m (cruza a ilha de norte a sul).

Os dados sobre condições climáticas tal como temperatura e umidade foram coletados no início e final da procura visual e enviados à estação meteorológica digital (Touchscreen ITWH-1080) que fica próxima ao farol. Para cada indivíduo avistado foram coletados dados de horário, coordenadas, e posicionamento em relação ao substrato (se o animal está enrodilhado, no chão da mata, em galhos ou passando pela trilha). Os espécimes foram capturados com o auxílio de um pinção e contidos em um tubo plástico transparente para coleta de dados biométricos aferidos por meio de fita métrica de 1m e sexagem por meio de inserção do sexador (estiletes de aço inox com ponta romba) pela parte posterior lateral da fenda anal (Figura 6).

Figura 6 - Sexagem de *B. insularis*

Durante a contenção física, as serpentes foram também inspecionadas quanto seu estado reprodutivo (Figura 7), e posteriormente devolvidas no mesmo ponto onde foram encontrados. Os hemipênis das serpentes possuem cavidade e estão invaginados na cauda, desta forma, apenas nos machos e em indivíduos intersexuados é possível a entrada do sexador, o que representa uma forma segura e pouco traumática de averiguar o sexo, mesmo em filhotes (MELGAREJO, 2002).

Figura 7 - Coleta de dados biométricos *in situ.*
Foto: Arquivos do ICMBio.

3.2 Coleta de dados *ex situ*

Foram coletados dados biométricos de espécimes de *B. insularis* em cativeiro, no Museu Biológico e Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan (LEEV) e do plantel de *B. insularis* do Centro de Estudos de Animais Peçonhentos (CEVAP) da UNESP Botucatu. Foram examinados 29 indivíduos, sendo 11 ♀ e três ♂ do Museu Biológico do Instituto Butantan (MBIB), 12 ♀ do LEEV, e duas ♀ e um ♂ do CEVAP. Além disso, animais do LEEV que vieram a óbito ao longo deste trabalho, também foram analisados (Figura 8). Os espécimes foram contidos e aferido o comprimento e sexados. Com o sexador inserido na cloaca, foi medida a profundidade de inserção do sexador com auxílio de um paquímetro, para aferição das medidas do hemipênis/hemiclitóris.

Figura 8 - Análise sexual de animais que foram a óbito.

3.3 Exames ultrassonográficos

Foram realizados exames mensais de ultrassonografia em um espécime prenhe, a partir de novembro de 2019, para um acompanhamento do desenvolvimento embrionário (Figura 9). Os exames foram feitos no Hospital Veterinário (HOVET) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) pela médica veterinária Viviane Campos Garcia.

Figura 9 - Ultrassonografia em fêmea de *B. insularis*.
Foto: Fabiano Andrade

3.4 Dados de terceiros

Dados de coleta entre 1995 a 2007, referente a 30 expedições realizadas à IQG pelo biólogo Marcelo Duarte foram compilados. Estes dados inéditos foram utilizados para comparação com a atividade reprodutiva que foi observada no presente estudo.

3.5 Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados em relação ao sexo e estação do ano. As variáveis de número de indivíduos, tamanho do hemipênis (direito e esquerdo), habitat e comportamento foram analisados em fatorial 3x4, com relação a sexo e estação do ano respectivamente, sendo primordialmente analisado o efeito de interação, e na ausência deste, foi analisado o efeito isolado. As variáveis CRC, CC e temperatura ambiente foram analisadas somente quanto a estação do ano. A variável altura acima do solo foi avaliada somente quanto a sexo. A comparação dos dados foi feita com o programa *Statistical Analyses* Systems (SAS version 9.4; SAS Institute, Inc., Cary,

NC, USA). Previamente à análise, foi verificada a normalidade dos resíduos através do teste de Shapiro-Wilk.

Os dados que não respeitaram a normalidade foram transformados e/ou feita a retirada de “outliers”. Os dados que mesmo após transformação não respeitaram a normalidade foram analisados por estatística não paramétrica de ordem pelo teste de Kruskal-Wallis. Os dados normais ou transformados foram analisados por análise de variância (ANOVA) quanto ao efeito de cada parâmetro. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo procedimento misto (PROC GLIMIX). As diferenças entre os grupos tanto na interação quanto no efeito individual de tratamento foram especificadas pelo teste de Tukey-Krammer. Para os dados de frequência expostos em porcentagem, foi utilizada a estatística de frequência (PROC FREQ) utilizando o teste de Qui-Quadrado ou exato de Fisher quando a amostra foi menor que 5. Para todas as comparações foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Dados *in situ*

Foram capturados 41 indivíduos no total das expedições de 2019 e 2020, sendo 23 ♀, 14 ♂ e quatro com sexo não identificados. Os animais foram avistados em cima de galhos, no chão da mata, passando pela trilha, enrodilhados ou ativos.

Durante a expedição realizada em 15 de setembro de 2019, um indivíduo foi capturado, as 10h43, para coleta de dados biométricos. Foi realizada a sexagem no local de coleta e constatado que o indivíduo não possuía hemipênis e nem hemiclitóris, concluindo, portanto, tratar-se de uma fêmea verdadeira (Figura 10).

O espécime (CRC: 730mm e CC: 120mm), estava enrodilhada a 1,50m de altura, sob a cisterna da ilha (24º28’S e 46º40’W), não continha microchip e por isso pode se afirmar que não havia sido capturada anteriormente. Durante a contenção, foi realizada a microchipagem (chip 9630008000237152). Devido a raridade de encontros de fêmeas verdadeiras, o espécime foi coletado para que fosse estudado com maior assertividade até o final do projeto. O espécime encontra-se no biotério de conservação de *B. insularis*, no LEEV do Instituto Butantan.

Figura 10 - Aferição de dados da fêmea “verdadeira” (chip 9630008000237152) coletada na Ilha da Queimada Grande em 15 de setembro de 2019.
Foto: Rafael Benneti.

4.2 Exames ultrassonográficos da fêmea verdadeira (CHIP 9630008000237152)

Nas primeiras imagens da ultrassonografia, realizadas em novembro de 2019 (Figura 11A e 11B), foi observada uma massa com o tamanho de 9mm. Em 20 de janeiro de 2020, durante a realização de uma segunda ultrassonografia, foi possível visualizar cinco embriões em desenvolvimento, detectando-se batimentos cardíacos, através do Doppler (Figura 11D), com auxílio do aparelho de ultrassom Sonosite Titan. Folículos da classe I (menores que 0,5 cm de diâmetro) e II (0,6 a 1,0 cm) foram encontrado em todos os meses, enquanto os da classe III (1,1 a 2,0 cm) e IV (2,1 e 3,0 cm), somente de abril a setembro. Foram encontrados folículos de classe III e IV, no exame de ultrassom de novembro, medindo até 3,29 cm. Já nos exames realizados em dezembro de 2019, os ovos ultrapassaram 4,0 cm de comprimento (Figura 11C).

Após a realização da ultrassonografia, foi feito um exame de radiografia (Figuras 12), onde foram observadas estruturas ovoides com média radiopacidade.

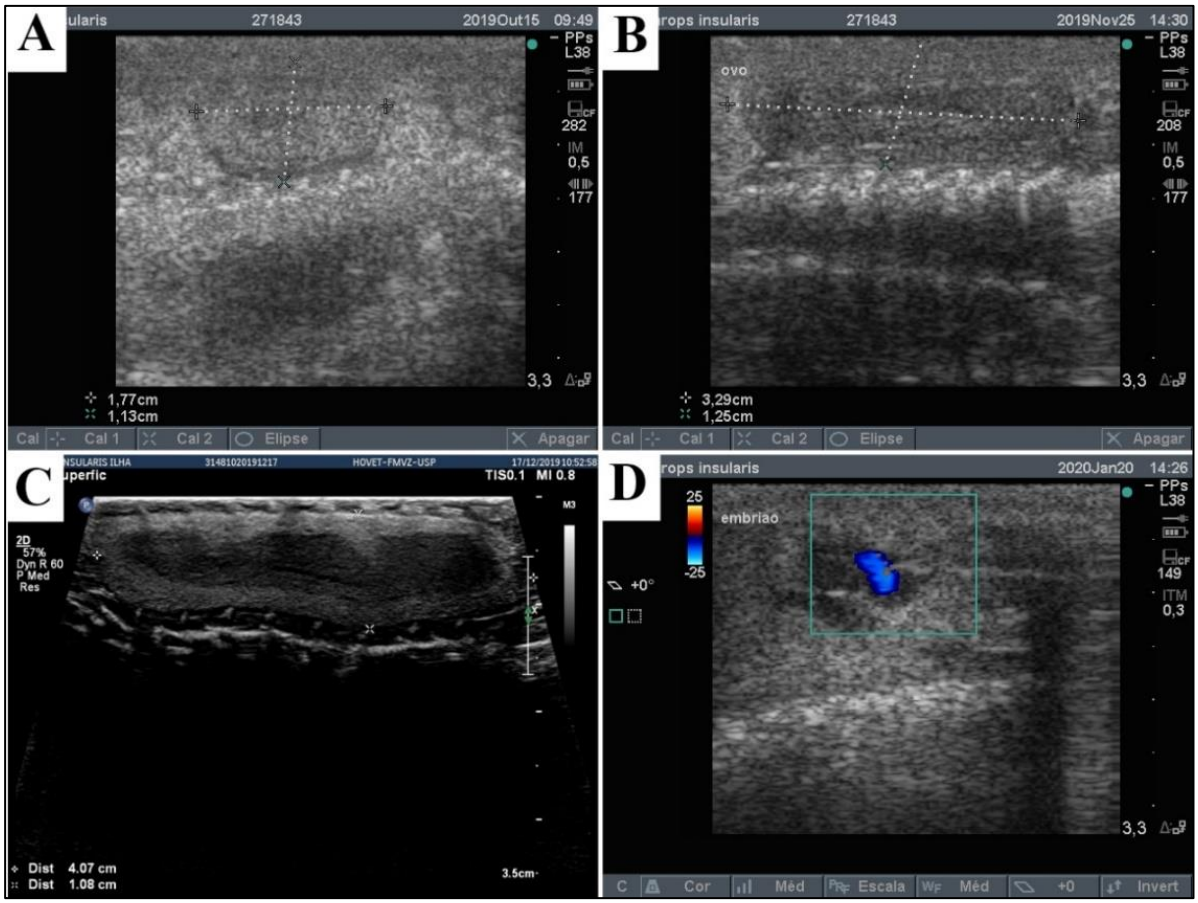


Figura 11 - Exames de ultrassom de *B. insularis*; (A e B) Folículo em vitelogênese secundária, com 1,77 cm e 3,29 cm de comprimento (realizada em novembro de 2019); (C) Ovo medindo 4,07 cm (realizada em dezembro de 2019); (D) Embrião de *Bothrops insularis* (realizada em janeiro de 2020).

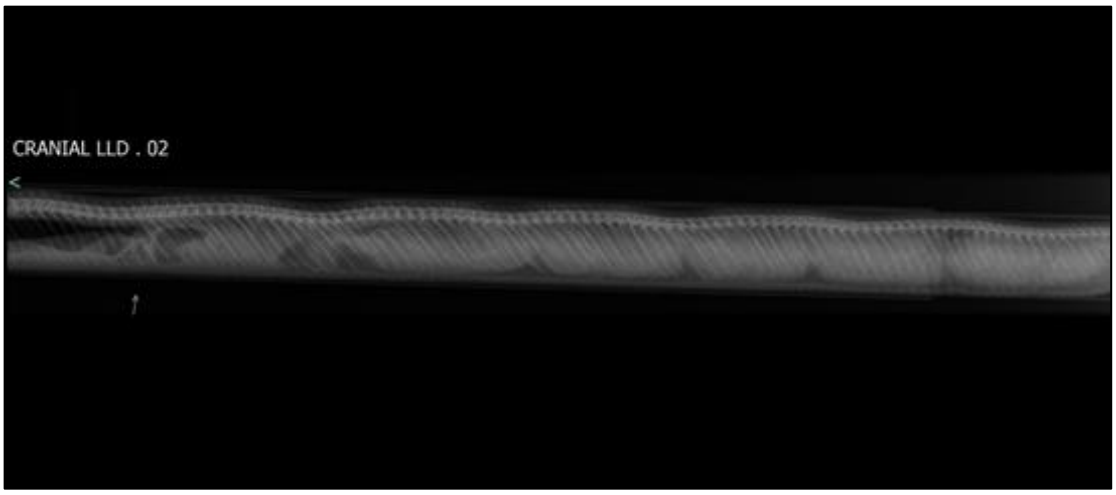


Figura 12 - Exame radiográfico de *B. insularis* onde foi observada estruturas ovoides (realizada em janeiro de 2020).

O último exame ultrassonográfico, foi realizado em 17 de fevereiro de 2020, onde foi possível observar que os embriões estavam bem desenvolvidos (Figura 13).

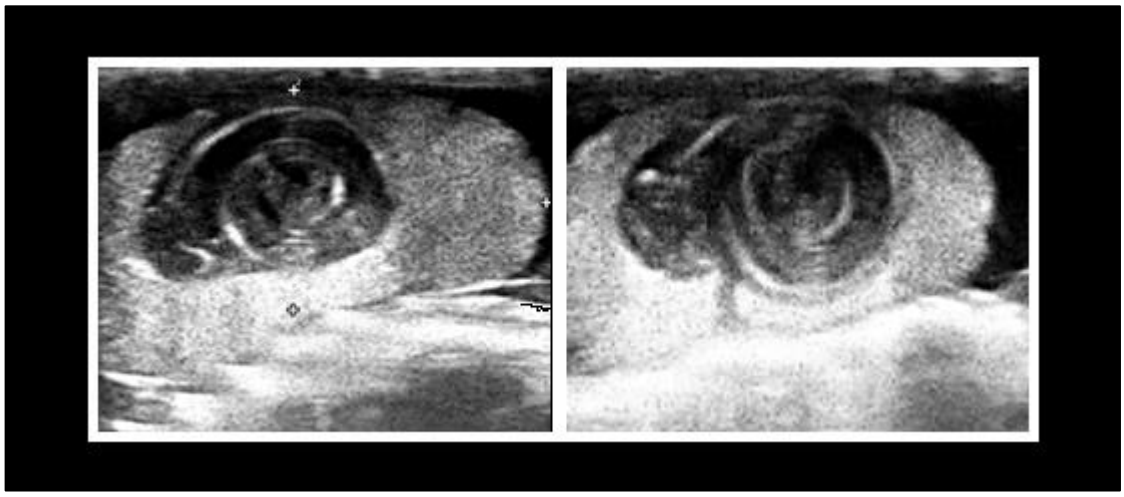


Figura 13 - Último exame de ultrassom de *B. insularis*, realizado em 17 de fevereiro de 2020.

4.3 Parturição

No dia 18 de maio de 2020, nasceram cinco filhotes saudáveis da fêmea verdadeira, concretizando o seu sucesso reprodutivo (Figura 14). Os filhotes nasceram com massa variando de 7 a 9 gramas, CRC entre 215mm a 240mm e CC entre 30 a 40mm (Tabela 1).

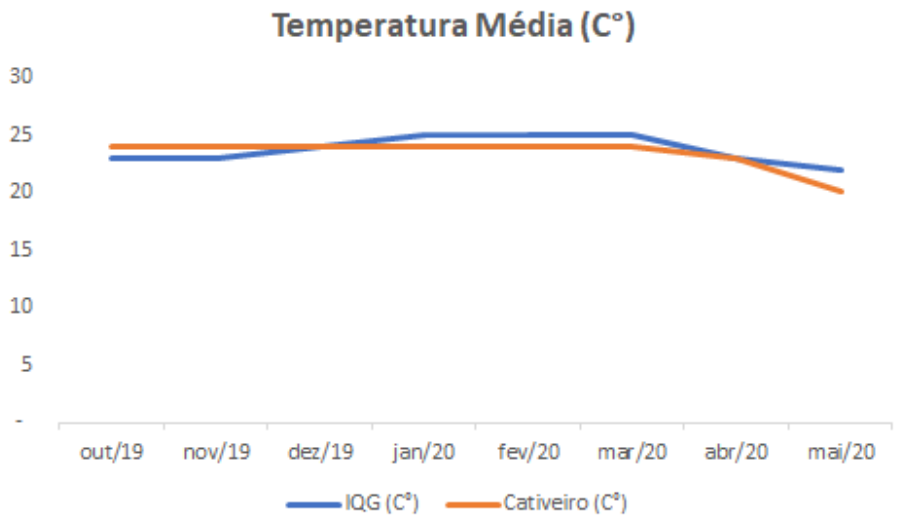
Tabela 1 – Comprimento rostro-cloacal (CRC), Comprimento caudal (CC) e massa dos filhotes de *B. insularis* (chip 9630008000237152) nascidos em cativeiro no LEEV oriundos de acompanhamento gestacional.

Filhotes	CRC (mm)	CC (mm)	Massa (g)
Filhote 1	240	35	10
Filhote 2	230	40	9
Filhote 3	230	40	9
Filhote 3	225	35	9
Filhote 5	215	30	7

Figura 14 - Filhotes nascidos da fêmea verdadeira em 18 de maio de 2020.

A temperatura média corpórea superficial do plantel no dia do nascimento, foi de 20,2 graus e 67% de umidade, não diferindo da temperatura do ar da sala do laboratório. Durante toda a gestação a temperatura do plantel e da Ilha da Queimada Grande foram monitoradas para posteriormente serem comparadas, porém não apresentaram diferenças significativas (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Temperatura corpórea superficial de espécimes do plantel de *B. insularis*, comparada com a temperatura do ar durante toda a gestação.



4.4 Temperatura média corpórea superficial de espécimes do plantel de *B. insularis* do Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV) durante o período gestacional da fêmea verdadeira (CHIP 9630008000237152)

Os indivíduos que foram a óbito no LEEV, foram analisados e, em alguns casos, realizado o preparo do órgão copulatório (hemipênis) (Figura 15), bem como se averiguar a presença do hemiclitóris em fêmeas. Em um dos casos, aferimos as medidas do hemiclitóris, registrando-se 18,33mm do lado direito, ausente no lado esquerdo, embora com músculos retratores em ambos os lados (Figura 15).

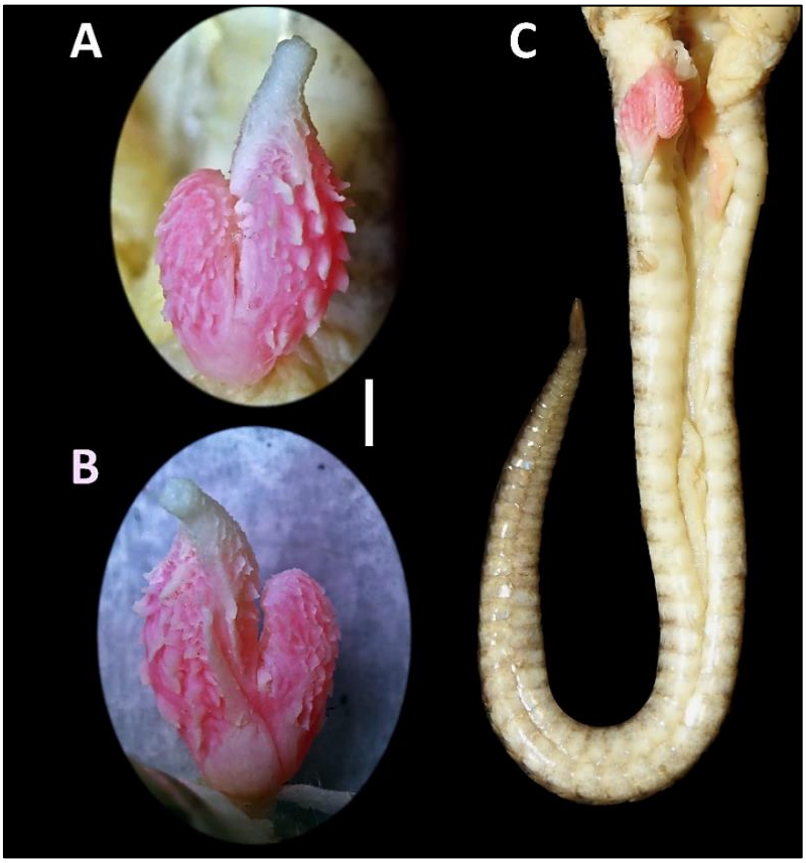


Figura 15 - Hemiclitóris de *Bothrops insularis*. (A) Vista do lado assulcado e (B) sulcado. (C) Eversão do hemiclitóris na cauda. Barra de escala vertical: 2 mm.

Outro caso que analisamos, foi de uma fêmea que também foi a óbito no plantel do (LEEV), constatando-se a ausência de hemiclitóris e músculos retratores neste indivíduo (Figura 16).

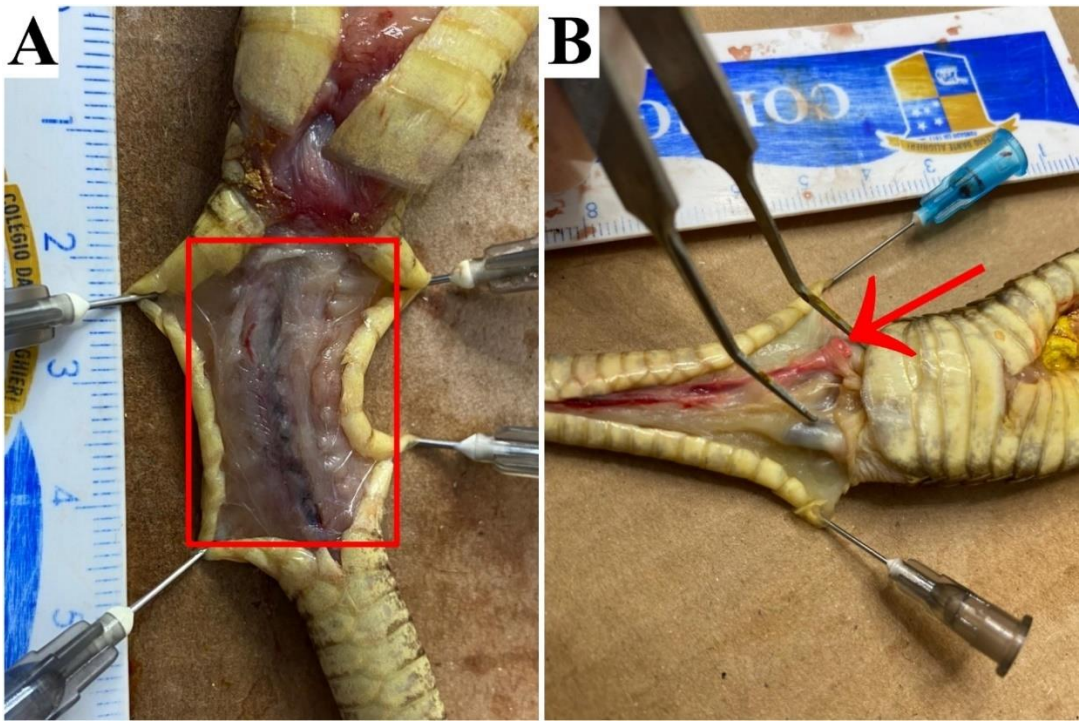


Figura 16 - Espécimes analisados: (16A) Fêmea sem a presença de hemiclitóris ou músculos retratores; (16B) Fêmea com hemiclitóris direito.
Foto: Kalena Barros.

4.5 Plantel do Museu Biológico do Instituto Butantan (MBIB)

Foram analisados 11 animais do MBIB assim constituídos, 11 ♀ e três ♂. Todos os indivíduos intersexos e fêmeas apresentaram padrões diferenciados, sendo o hemiclitóris esquerdo ausente em 5 indivíduos intersexos, bem como ausente em ambos os lados nos outros 5 espécimes (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados biométricos de animais pertencentes ao plantel do Museu Biológico do Instituto Butantan.

IBSP	Sexo	HD*(mm)	HE*(mm)
5466	F	15,04	x
5467	F	X	x
5684	F	X	x
5692	F	10,96	x
6012	F	15,73	x
6013	F	10,10	x
6014	F	X	x
6153	F	X	x
6154	F	X	x
6159	F	9,32	x

HD* (hemiclitóris direito); HE* (hemiclitóris esquerdo); x (hemiclitóris inexistente)

Analisamos a “fêmea matriz”, responsável pelo nascimento desta ninhada, que estava depositada na Coleção Herpetológica Alphonse Richard Hoge do Instituto Butantan (IBSP 89912), para verificar a existência ou não do hemiclitóris. Para melhores resultados na análise, foi feita a eversão do tecido, a fim de verificar se existia algum vestígio de hemiclitóris. Para isto, o órgão foi fotografado, porém o espécime não apresentou qualquer vestígio do órgão, sendo inexistente no lado direito e esquerdo (Figura 17).

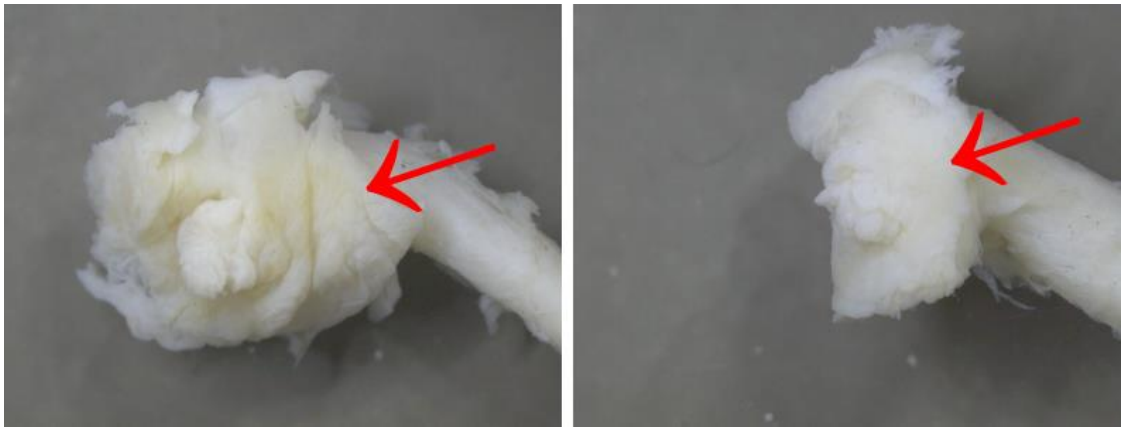
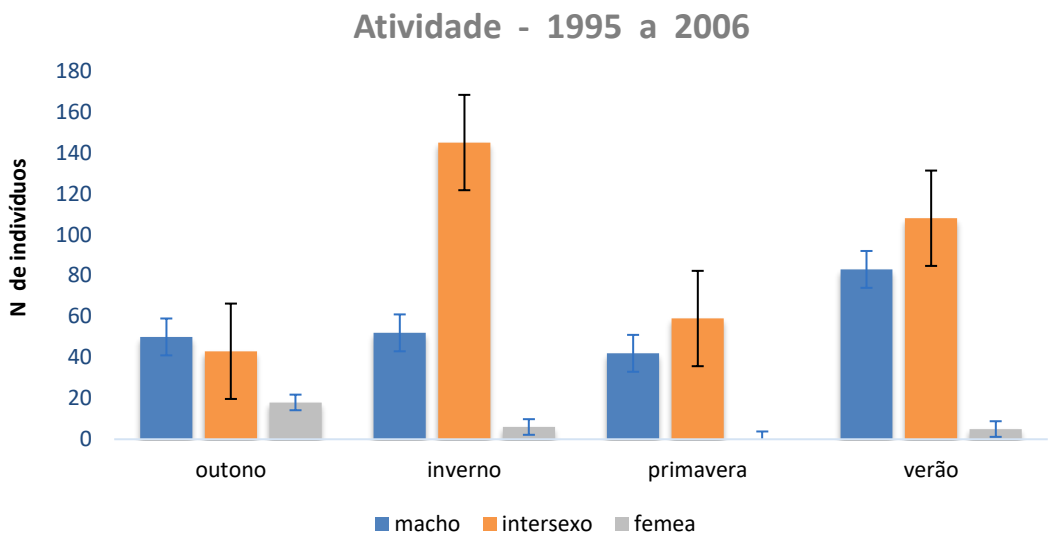


Figura 17 - Tecido evertido do espécime IBSP89912, reforçando a inexistência de hemiclitóris.

4.6 Dados de terceiros dos órgãos copulatórios *in situ*

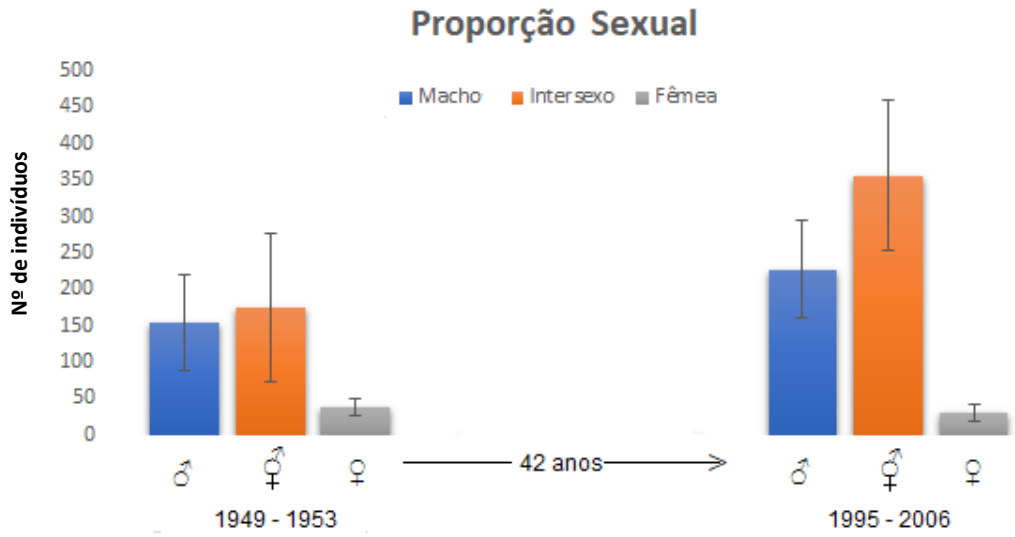
Para comparação do número de indivíduos machos, intersexos e fêmeas foram confeccionados dois gráficos, dos dados coletados *in situ*, do presente trabalho, período de 1995 a 2006 (Gráfico 2) e da pesquisa feita por Hoge e colaboradores no período de 1949 a 1953 (Gráfico 3).

Gráfico 2 - Número de indivíduos por sexo de *B. insularis* observados de 1995 a 2006 durante as estações.



.

Gráfico 3 – Proporção sexual de *B. insularis* (Adaptado de Hoge et al., 1959).



4.7 Análises estatísticas

4.7.1 Número de indivíduos encontrados

Foi observada diferença (p<0,0001) entre a porcentagem de indivíduos de diferentes sexos nas diferentes estações do ano. (Tabela 1). Podemos observar que indivíduos intersexos possuem a maior frequência de encontros em todas as estações, comparados com machos e fêmeas da ilha. Além disso, os dados mostram que indivíduos intersexos são mais frequentes no inverno, que corresponde ao período reprodutivo da espécie, descrito na literatura de maio a setembro (MARQUES, 2013). No outono e na primavera, não houve diferenças estatísticas na frequência de encontros de machos e intersexos. Já os machos, apresentaram maior frequência no verão, correspondente aos meses de dezembro a março.

Tabela 3 - Porcentagem (%) e número (observado/total) de indivíduos encontrados de cada sexo ao longo das estações do ano.

Estação	**Sexo**			**Total**
	Fêmea	**Intersexo**	**Macho**	
Inverno	3.99 (27/245)^{cA}	22.93 (155/245)^{aA}	9.32 (63/245)^{bB}	36.24(245)
Outono	1.18 (8/119)^{bB}	7.4 (50/119)^{aC}	9.02 (61/119)^{aB}	17.6 (119)
Primavera	0.44 (3/105)^{bB}	8.73 (59/105)^{aC}	6.36 (43/105)^{aB}	15.53 (105)
Verão	0.44 (3/207)^{bB}	17.01 (115/207)^{aB}	13.17 (89/207)^{aA}	30.62 (207)
Total	6.07 (41)	56.07 (379)	37.87 (256)	100 (676)

^{a,b,c} letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística de frequência na linha (p<0,05) pelo teste exato de Fisher ou de Qui-quadrado
^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas indicam diferença estatística de frequência na coluna (p<0,05) pelo teste exato de Fisher ou de Qui-quadrado

4.7.2 Tamanho do hemipênis direito

Não foi observado efeito de interação entre sexo e estação do ano para o tamanho do hemipênis direito (p=0,34), entretanto foi observado efeito individual de sexo (p <.0001) e de estação do ano (p= 0.005). (Tabela 2). Machos e indivíduos intersexos apresentaram maior tamanho de hemipênis no inverno. No outono e no verão não foram observadas diferenças estatísticas nos tamanhos. Na primavera, não houveram aferições suficientes para as análises.

Tabela 4 - Média ± erro padrão da média do tamanho do hemipênis/hemiclitóris direito de machos e intersexos ao longo das estações do ano.

Estação	**Sexo**		**Total (mm)**
	Intersexo (mm)	**Macho (mm)**	
Inverno	11.97 ±0.69	19.95 ±0.61	14.85 ±0.7^{A}
Outono	10.81 ±1.32	16.19 ±0.86	13.68 ±0.84^{B}
Primavera	0 ±0	0 ±0	0 ±0
Verão	8.74 ±0.71	18.35 ±0.85	12.83 ±0.76^{B}
Total	10.37 ±0.51^{b}	17.97 ±0.5^{a}	13.7 ±0.45

^{a,b} letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística na linha pelo teste de Tukey-Krammer (p<0,05)
^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas indicam diferença estatística na coluna pelo teste de Tukey-Krammer (p<0,05)

4.7.3. Tamanho do hemipênis esquerdo

Foi observado efeito de interação entre sexo e estação do ano para o tamanho do hemipênis esquerdo (p <.0001), portanto, foi apresentado o efeito de interação independente do efeito individual (Tabela 5). Não foram observados diferença no tamanho do hemipênis esquerdo de indivíduos intersexos, independente da estação do ano. Machos apresentaram maior tamanho do hemipênis esquerdo no inverno e

no outono, posteriormente. No verão, não houve diferenças estatísticas no tamanho do hemipênis esquerdo, em relação aos números obtidos no outono e no inverno.

Tabela 5 - Média ± erro padrão da média do tamanho do hemipênis/hemiclitóris esquerdo de machos e intersexos ao longo das estações do ano.

Estação	**Sexo**		**Total (mm)**
	Intersexo (mm)	**Macho (mm)**	
Inverno	8.34 ±0.71[b]	19.32 ±0.82[aA]	12.37 ±0.87
Outono	7.73 ±0.73[b]	16.35 ±0.98[aB]	12.33 ±0.83
Primavera	0 ±0	0 ±0	0 ±0
Verão	6.74 ±0.51[b]	18.03 ±0.87[aAB]	11.48 ±0.78
Total	7.52 ±0.37	17.74 ±0.54	12 ±0.48

[a,b] p<0,05 pelo teste de Kruskal-Wallis
[A,B] letras maiúsculas sobrescritas indicam diferença estatística na coluna pelo teste de Kruskal-Wallis (p<0,05)

4.7.4. Microhabitat no local de Encontro - Atividades de machos, fêmeas sem hemiclitóris e intersexos *in situ*

No inverno, foram registradas maior frequência de indivíduos intersexos no solo e na vegetação. Fêmeas sem hemiclitóris, são encontradas no solo e na vegetação (Figura 18A, B, C, D e F), sem diferença estatística significativa. Independente do sexo de *B. insularis*, a maior parte dos indivíduos são encontrados no solo (Tabela 6).

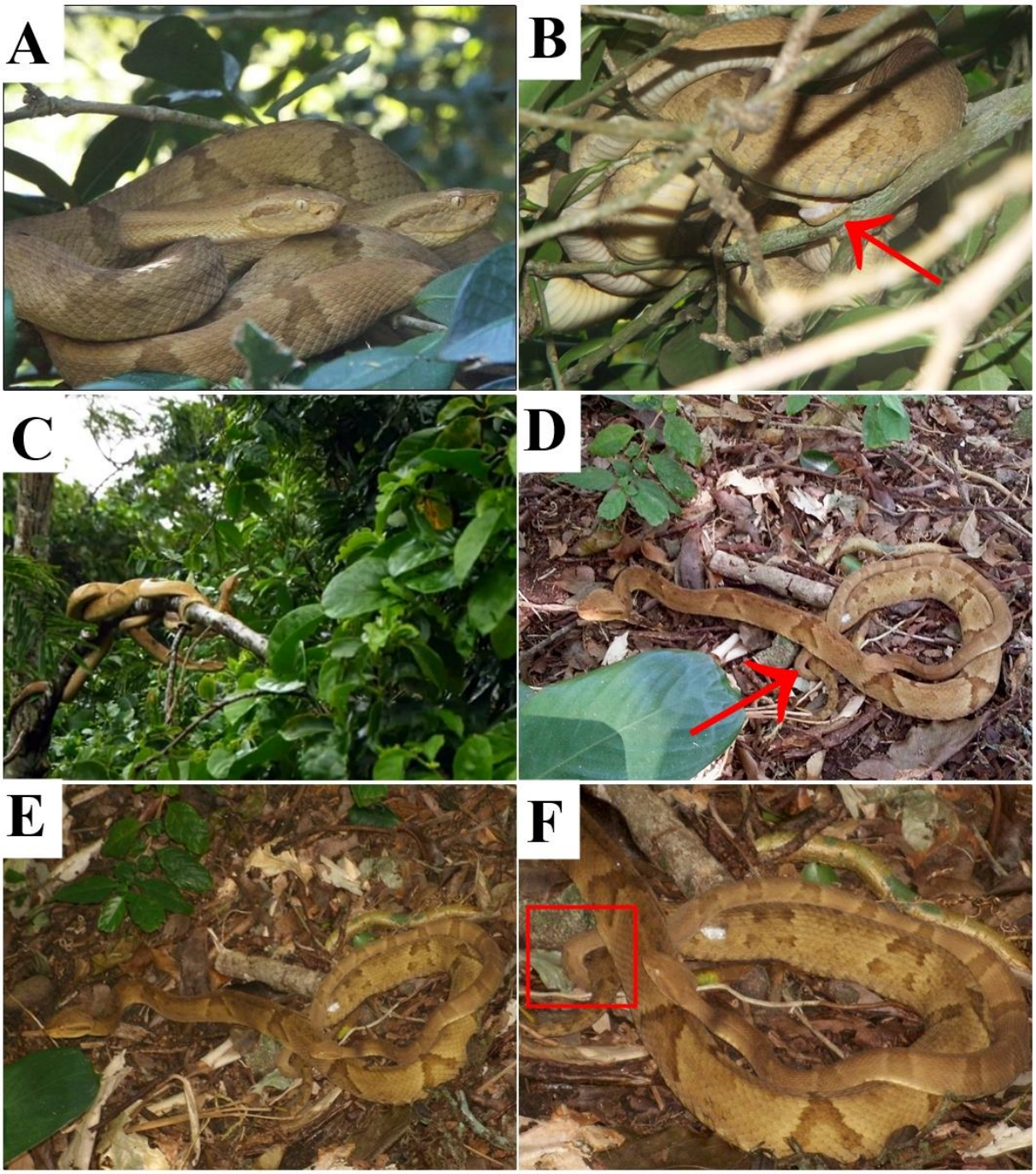


Figura 18 – (18A) Casal de *B. insularis* no período reprodutivo; (18B) Cloaca avolumada, indicando possível evento de corte ou pós-cópula (registro realizado no mês de junho); (18C) Fêmeas de *B. insularis* sobre a vegetação durante o período reprodutivo; (18 E e F) Registro de cópula no solo).
Foto: (A e B) Flora Ortiz; (D, E e F) adaptado de Amorim et al. (2019).

No outono, foram encontrados maior número de intersexos e machos no solo do que na vegetação. Entretanto, encontros com fêmeas sem hemiclitóris

nesta estação, foram mais frequentes na vegetação (Figura 18C), ao contrário da frequência de indivíduos machos neste mesmo período (Tabela 7).

Na primavera, não foi observada interação reprodutiva, porém houve efeito estacional entre sexo e habitat. Estatisticamente, o número de indivíduos intersexos e machos é indiferente, e fêmeas sem hemiclitóris são encontradas em menor número nesta época.

Tabela 6 - Porcentagem (%) e número (observado/total) de indivíduos encontrados de cada sexo ao longo das estações do ano.

Estação	Habitat	Sexo			Total	p valor		
		Fêmea	Intersexo	Macho		Interação	Sexo	Habitat
Outono	**Solo**	0.86 (1/67)^{bB}	22.41 (26/67)^{a}	34.48 (40/67)^{aA}	57.76	0.007	<.0001	0.3
	Vegetação	6.03 (7/49)^{bA}	19.83 (23/49)^{a}	16.38 (19/49)^{aB}	42.24			
	Total	6.9 (8/116)	42.24 (49/116)	50.86 (59/116)	100			
Inverno	**Solo**	7 (17/196)^{c}	53.09 (129/196)^{aA}	20.58 (50/196)^{bA}	80.66	0.04	<.0001	<.0001
	Vegetação	4.12 (10/47)^{b}	10.29 (25/47)^{aB}	4.94 (12/47)^{bB}	19.34			
	Total	11.11 (27/243)	63.37 (154/243)	25.51 (62/243)	100			
Primavera	**Solo**	0.95 (1/82)	45.71 (48/82)	31.43 (33/82)	78.1^{A}	0.14	<.0001	<.0001
	Vegetação	1.9 (2/23)	10.48 (11/23)	9.52 (10/23)	21.9^{B}			
	Total	2.86 (3/105)^{b}	56.19 (59/105)^{a}	40.95 (43/105)^{a}	100			
Verão	**Solo**	0.49 (1/175)	48.54 (100/175)	35.92 (74/175)	84.95^{A}	0.07	<.0001	<.0001
	Vegetação	0.97 (2/31)	7.28 (15/31)	6.8 (14/31)	15.05^{B}			
	Total	1.46 (3/206)^{b}	55.83 (115/206)^{a}	42.72 (88/206)^{a}	100			
Total	**Solo**	2.99 (20/520)^{c}	45.22 (303/520)^{aA}	29.4 (197/520)^{bA}	77.61	<.0001	<.0001	<.0001
	Vegetação	3.13 (21/150)^{b}	11.04 (74/150)^{aB}	8.21 (55/150)^{aB}	22.39			
	Total	6.12 (41/670)	56.27 (377/670)	37.61 (252/670)	100			

^{a,b,c} letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística de frequência na linha ($p<0,05$) pelo teste exato de Fisher ou de Qui-quadrado
^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas indicam diferença estatística de frequência na coluna ($p<0,05$) pelo teste exato de Fisher ou de Qui-quadrado

Tabela 7 - Média ± erro padrão da altura em relação ao solo em que os animais foram encontrados, baseado em seu sexo.

	Sexo			Total	p valor
	Fêmea	**Intersexo**	**Macho**		
Altura	1.36 ±0.28[a]	0.5 ±0.08[b]	0.47 ±0.08[b]	0.59 ±0.06	<.0001

[a,b] p<0,05 pelo teste de Kruskal-Wallis

5 DISCUSSÃO

Um estudo populacional de *B. insularis* foi realizado na ilha da Queimada Grande por Hoge et al. (1959). Neste estudo, foi encontrado uma proporção de machos, fêmeas “verdadeiras”, isto é, fêmeas sem hemiclitóris, denominadas por estes autores como “estéreis” e indivíduos intersexuados (fêmeas que possuem “hemipênis”). Posteriormente essa estrutura foi denominada como “hemiclitóris” por Böhme (1995). Esta análise da população foi realizada em duas amostragens, separadas por um intervalo de aproximadamente 25 anos. Os resultados mostraram uma mudança na proporção dos sexos durante esse período, com uma redução do número de machos, aumento do número de indivíduos intersexos e frequência estacionária das fêmeas ditas “verdadeiras”. Estudos mais recentes, no entanto, não demonstraram a existência de fêmeas ditas “verdadeiras” ou sem hemiclitóris (KASPEROVICZUS, 2009).

Apesar de Hoge et al. (1959) afirmarem que fêmeas de *B. insularis* possuem um órgão copulador menor e menos desenvolvido que os hemipênis dos machos, amostras de hemiclitóris de animais de coleção analisados por Kasperoviczus (2009), mostraram a morfologia dos lobos semelhantes aos dos machos e também a presença de músculos retratores.

Nossa análise das fêmeas intersexuadas evidenciou que o tamanho dos hemiclitóris são muito próximos dos hemipênis dos machos. Analisamos e comparamos os hemipênis e hemiclitóris direito e esquerdo e observamos que durante a época reprodutiva o órgão copulatório direito, apresentou maior tamanho, tanto em machos quanto em fêmeas intersexuadas.

Em relação ao tamanho dos hemipênis, Shine et al. (1999) considera que caudas mais longas aumentam a aptidão do macho por ampliar espaço para hemipênis maiores, aumentando a capacidade de obter acasalamentos. Portanto, a relação entre o comprimento da cauda e o comprimento do hemipênis provavelmente reflete uma associação funcional. Apesar de não haver evidências de que um hemipênis maior aumenta o sucesso reprodutivo, tudo indica que hemipênis maiores podem ser mais vantajosos em relação à hemipênis menores (SHINE et al., 1999). No geral, nossos dados reforçam a hipótese de que indivíduos machos e intersexos, são alvos da seleção sexual quanto ao tamanho e assimetria dos hemipênis e hemiclitóris.

Ainda não se sabe se o hemiclitóris é um órgão funcional em *B. insularis* (AMORIM et al., 2019), porém, Kasperoviczus et al. (2009) descrevem que está presente na fêmea intersexuada toda musculatura necessária para sua eversão. Em laboratório, foi observado fêmeas intersexuadas everterem e movimentarem o hemiclitóris. Por estas razões, sugerimos que o órgão possa ser funcional.

Há outras espécies de serpentes em que esse fenômeno é mais raro, ou seja, apenas poucas fêmeas nas populações apresentam hemipênis, como é o caso da serpente chinesa *Pareas* sp. Stanley e *Pseudoficimia frontalis* (Hardy, 1970). Entre as jararacas este fenômeno também não está restrito a *B. insularis*. Uma fêmea de *B. moojeni* apresentou o hemipênis direito bem desenvolvido, enquanto o esquerdo possuía menor tamanho (BARROS et al., 2020). Esta fêmea prenhe (12 embriões bem desenvolvidos nos ovidutos) demonstra a capacidade destes indivíduos intersexo reproduzirem e deixarem descendentes (BARROS et al., 2020), como em *Bothrops insularis*.

Hoge et al. (1959), verificaram durante as expedições que todos exemplares coletados prenhes eram intersexos, afirmando que as “fêmeas verdadeiras” eram estéreis. Porém, com o espécime coletado no presente trabalho, demonstrou-se que ainda há fêmeas verdadeiras férteis na ilha, não corroborando a hipótese de Hoge e seus colaboradores. Além disso, foram observados outros exemplares que não possuíam hemiclitóris. Com o acompanhamento ultrassonográfico e radiográfico, desse exemplar, foi possível acompanhar o sucesso e evolução dos embriões, da gestação ao nascimento dos cinco filhotes, o que comprova que fêmeas verdadeiras não são estéreis. Segundo Matayoshi et al. (2012) a ultrassonografia é um método diagnóstico seguro, não invasivo e eficiente utilizado na medicina de répteis. Suas aplicações incluem monitoramento da função reprodutiva e diagnóstico de patologias por meio da análise das mudanças anatômicas e topográfica dos órgãos. Dessa forma, o uso da ultrassonografia é imprescindível para o acompanhamento gestacional.

Almeida-Santos e Salomão (2002) descreveram que o desenvolvimento embrionário é claramente visível a partir de outubro e Kasperoviczus (2009), observa ovos e embriões nos ovidutos de outubro (início da primavera) a abril (início do outono) sugerindo um período gestacional de quatro a cinco meses, corroborando com os resultados do presente trabalho.

Em animais com sazonalidade reprodutiva torna-se necessário um conhecimento ainda maior de seus ciclos reprodutivos, uma vez que os diversos eventos e etapas envolvidos no processo reprodutivo sofrem grandes influências das condições climáticas e ambientais (POPE; GÓMEZ; DRESSER, 2006).

Após 42 anos da pesquisa de Hoge et al. (1959), nossos dados apontaram que, apesar do número de fêmeas com ausência de hemiclitóris na ilha ser baixo, encontros com esses indivíduos ainda ocorrem, apesar de raro. Ainda que esses encontros sejam raros, coletas e/ou análises anatômicas *in situ* se tornam imprescindíveis para o aprofundamento da dinâmica reprodutiva destas serpentes. Conforme previsto por Hoge et al. (1959), houve um aumento de indivíduos intersexos ao longo dos anos, porém não houve diminuição de indivíduos machos.

Análises acuradas das medidas biométricas dos exemplares, coletados entre 1995 a 2006, apontaram pela primeira vez, que a proporção sexual de indivíduos intersexuados aumentou ao longo dos anos, diminuindo a frequência de machos e “fêmeas verdadeiras”, principalmente no período reprodutivo durante o inverno, que corrobora dados coletados por Hoge et al. 1959.

Embora eventos de corte sejam mais frequentemente presenciados por alguns autores (KASPEROVICZUS, 2009; MARQUES et al., 2013), eventos de cópula são raros tendo sido recentemente pioneiramente publicado (AMORIM et al., 2019). Uma hipótese para este fenômeno pode estar associada à duração desse comportamento, sendo eventos de corte mais longos do que a cópula efetivamente.

As atividades reprodutivas na ilha, foram observadas principalmente no final do outono e inverno. Neste período foi registrada maior frequência de indivíduos intersexos e um menor número indivíduos machos, tanto no solo como na vegetação. Embora alguns casais tenham sido observados nesta época, os morfotipos (machos, intersexos e fêmeas) não foram determinados. Machos provavelmente apresentam baixa atividade no início do inverno, devido a quiescência do ciclo espermatogênico (KASPEROVICZUS, 2009). Fêmeas sem hemiclitóris, são encontradas no solo e na vegetação, sem diferença estatística significativa.

Dada a frequência de fêmeas intersexuadas, uma hipótese alternativa foi proposta por Amorim et al (2019). Uma vez que fêmeas de *B. insularis* apresentam um órgão copulador, hemiclitóris que apresenta funcionalidade e tamanho, a existência de um comportamento de pseudocópula (CREWS; FITZGERALD, 1980)

não pode ser rejeitada. Assim, devido ao prolongado período de acasalamento de *B. insularis* e de fêmeas vitelogênicas no final do outono e inverno (MARQUES et al., 2013), esta pseudocópula poderia acelerar a vitelogênese, desencadeando mecanismos neuroendócrinos reprodutivos, como visto em alguns lagartos (CREWS; FITZGERALD, 1980) e cobras (WHITTIER; CREWS, 1986). Entretanto, outros estudos comportamentais devem ser conduzidos na Ilha da Queimada Grande para testar esta hipótese.

Em virtude de seu “status” de criticamente em perigo e algumas evidências previamente apresentadas, fica reforçada a necessidade da manutenção desse viperídeo por meio de uma estratégia de longo prazo de reprodução em cativeiro. Todavia, um dos maiores obstáculos para o sucesso na reprodução *ex situ* de répteis é o desconhecimento sobre diversos aspectos ecológicos desses vertebrados, incluindo sua biologia reprodutiva (BARROS et al., 2020).

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível observar a existência de dois morfotipos, aqui chamadas de fêmeas sem hemiclítoris e os intersexos, em que os intersexos apresentam maior atividade ao longo das estações, com maior pico no período reprodutivo (outono/inverno). A proporção sexual de indivíduos intersexuados aumentou ao longo dos anos, diminuindo a frequência de machos e fêmeas sem hemiclitóris, principalmente no período reprodutivo. Apesar de raro, é possível encontros com fêmeas sem hemiclitóris na ilha, sendo encontradas com mais frequência na vegetação do que no solo.

O período de gestação da fêmea verdadeira do presente estudo, foi de cinco meses, corroborado com dados descrito na literatura, onde foi possível constatar que fêmeas sem hemiclitóris não são estéreis, podendo sim, gerar proles viáveis, garantindo a perpetuação da espécie. Os machos possuem maior atividade no outono e no verão, com baixa frequência no inverno. No mês de março foi encontrado um maior número de indivíduos na vegetação do que no solo, o que pode estar relacionado com a época de migração de aves na ilha, relacionado com a época de alimentação de *B. insularis*.

O hemipênis direito dos machos e hemiclitóris direito de indivíduos intersexos, são maiores no período reprodutivo, sugerindo-se que indivíduos intersexos mostram

a mesma habilidade como o hemipênis direito dos machos o que pode ser um indicativo de funcionalidade deste órgão.

O monitoramento da espécie *in situ* é primordial para que se compreenda melhor suas estratégias reprodutivas, além de contribuir com parâmetros para a criação *ex situ* de um grupo reprodutivo viável, visando contribuir com sua conservação.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, C. R.; AMORIM, L. G. S.; MAGALHÃES, A. M.; AZEVEDO, C. R.; GRISI-FILHO.; DIAS, R. A. Extinction risk evaluation and population size estimation of *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae), a critically endangered insular pitviper species of Brazil. South American **Journal of Herpetology**, v. 19, p. 32–39. 2021.

ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae)**. 2005. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

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 level and interplay between steroid hormones and vasotocinase. **General and Comparative Endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 143–150. 2004.

ALMEIDA-SANTOS, S.M.; ORSI, A. M. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus e Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morfologia e função do oviduto. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, v. 26, p. 109–12. 2002.

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

AMARAL, A. Contribuição para o conhecimento dos ophidios do Brasil. IV Lista remissiva dos ofídios do Brasil. **Anexos Mem. Inst. Butantan**, v. 4, p. 69–125. 1929.

AMARAL, A. Contribuição para o conhecimento dos ophideos do Brasil. A. Parte I. Descrição de uma nova espécie. **Anexos Memórias do Instituto Butantan**, v. 1, p. 18–37. 1921.

AMARAL, A. Excursão a Ilha da Queimada Grande: notas sobre a biologia de uma *Lachesis* ali existente. **Anexos Mem. Inst. Butantan**, v. 2, p.49–57. 1927.

AMORIM, L. G. S.; AZEVEDO, C. R.; AZEVEDO, W. S.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. First record of mating of *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) in nature, with comments on sexual behaviour. **Herpetology Notes**, v. 12, p. 225–227. 2019.

AUBRET, F, SHINE, R, BONNET, X. Adaptive developmental plasticity in snakes. **Nature**, v. 431, p. 261–262. 2004.

BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Biologia reprodutiva das serpentes jararacas:** ciclos e comportamentos, dimorfismo e maturidade sexual. Novas Edições Acadêmicas. 173 p. 2020.

BEÇAK, M.L.; RABELLO-GAY, M. N.; BEÇAK, W., SOMA, M.; BATISTIC, R. F.; TRAJTENGERTZ, I. **The W chromossome during the evolution and in sex abnormalities of snakes. DNA content, C-banding**. In: OLMO, E (Editor). Cytogenetics of amphibians and reptiles, Birkhauser Verlag, Basel, pp 221–240. 1990.

BERNARDE, P. S. **Anfíbios e répteis: introdução ao estudo da herpetofauna brasileira.** Curitiba: Anolis Book, 320p. 2012.

BÖHME, W. Hemiclitoris discovered: a fully differentiated erectile structure in female monitor lizards (Varanus spp.) (Reptilia: Varanidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 33, p. 129–132. 1995.

BOOTH, W.; SMITH, C.F.; ESKRIDGE, P.H.; HOSS, S.K.; MENDELSON, J.R.; SCHUETT, G.W. Facultative parthenogenesis discovered in wild vertebrates. **Biology Letters**, v. 8, p. 983–985. 2012.

BOVO, R.P.; MARQUES, O. A. V; ANDRADE, D. V. When basking is not an option: thermoregulation of a viperid snake endemic to a small island. **Copeia**, v. 3, p. 408–418. 2012.

CARREIRA, S.; MANEYRO, R. **Guía de Reptiles del Uruguai**. Ediciones de la Fuga. 285p. 2013.

CEI, J. M. **Reptiles del noroeste y este de la Argentina**. Herpetofauna de las Selvas subtropicales, Puna y Pampas. Torino - Museo Regionale di Scienze Naturali. 1993.

CORREA, P. G. **Monitoramento e estudos moleculares de ovos atrésicos de serpentes do gênero *Bothrops***. Tese (Doutor em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2019.

COSTA, H.C.; BÉRNILS, R.S. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**, v. 7, n.1. 2018.

CREWS, D.; FITZGERALD, K. T. “Sexual” behavior in parthenogenetic lizards (Cnemidophorus). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 1, p. 499–502. 1980.

CULLEN JR, L.; RUDRAN, R.; VALLADARES- PÁDUA, C. **Método de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. 2 ed. Curitiba: Editora UFPR, 2003.

ESTEVES, R. G. **Comportamento alimentar e aspectos reprodutivos de *Bothrops insularis* (Amaral, 1921) (Serpentes: Viperidae), na criação ex-situ no Instituto Vital Brazil**. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2016.

FORBES, T. R. **Intersexuality in reptiles**. In Intersexuality in vertebrates including man, p. 273–284. In: ARMSTRONG, C. N.; MARSHALL, A. J. (Eds.). Academic Press, New York. 1964.

GOLDSCHMIDT, R. Intersexuality and the endocrine aspect of sex. **From the Osborn Zoological Laboratory**, Yale University, v. 1, p. 433–456. 1917.

GRAZZIOTIN, F. G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S. L. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 3969– 82. 2006.

HARDY, L. M. Intersexuality in a Mexican Colubrid Snake (Pseudoficimia). **Herpetológica**, v. 26, p. 336–343. 1970.

HOGE, A. R.; BELLUOMINI, H. E.; SCHREIBER, G.; PENHA, A. M. Sexual abnormalities in *Bothrops insularis* (Amaral, 1921) (Serpentes). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 29, p. 17–88. 1959.

HOWARD, J. G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M. E. **Zoo & wild animal medicine current therapy**. Philadelphia: Saunders, p. 390–399. 1993.

IUCN. **The IUCN Red List of thre atened species**. Available from: http://www.iucnredlist.org (accessed 10 June 2015) Loefgren, A. (1915) O gênero *Rhipsalis*. Archivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v.1, p. 59–104. 2016.

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

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. 1993.

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

KASPEROVICZUS, K. N., SANTOS, L.C.; ALMEIDA-SANTOS, S. First report of hemiclitores in a female of the amphisbaenian *Amphisbaena microcephala* (Wagler, 1824). **Herpetology notes**, v. 4, p. 41–43. 2011.

KASPEROVICZUS, K. N.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Instituto Butantan e a jararaca-ilhoa: cem anos de história, mitos e ciência. **Cadernos de História da Ciência – Instituto Butantan**, v. 8, n. 2. 2012.

KEARNEY, M.; FUJITA, M.K.; RIDENOUR, J. Lost Sex in the Reptiles: Constraints and correlations. In **Lost Sex - The Evolutionary Biology of Parthenogenesis**, p. 447–474. Schön, I., Martens, K. & van Dijk, P. (Eds.). Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York. 2009.

LEMA, T. **Os Répteis do Rio Grande do Sul**. Atuais e Fósseis-Biogeografia - Ofidismo. Porto Alegre: Edipucrs, 2002.

MACARRÃO, A. **Avifauna da ilha da Queimada Grande, SP: diversidade, estrutura trófica, sazonalidade**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho": Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, 2010.

MACHADO, A. B. M.; MARTINS C. S.; DRUMMOND, G. M. **Livro vermelho da Fauna Brasileira ameaçada de extinção**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas. 2008.

MAGALHÃES, A. M. **Caracterização das fisionomias vegetais da Ilha Queimada Grande - Itanhaém/SP, como subsídio à elaboração do Plano de Manejo da Área de Relevante Interesse Ecológico das Ilhas Queimada Pequena e Queimada Grande**. 2015. Tese. Escola Nacional de Botânica Tropical, Brazil, 2015.

MARQUES O. A. V.; KASPEROVICZUS, K.; ALMEIDA-SANTOS S. M. Reproductive ecology of the threatened pitviper *Bothrops insularis* from Queimada Grande Island, southeast Brazil. **JHerpetol**, v. 47, p. 393–399. 2013.

MARQUES, O. A. V. Reproduction, seasonal activity and growth of the coral snake, *Micurus corallinus* (Elapidae), in the south eastern Atlantic Forest of Brazil. **Amphibia-Reptalia**, v.17, p. 277–285. 1996.

MARQUES, O. A. V.; MARTINS, M.; SAZIMA, I. A new insular species of pitvipers from Brazil, with comments on evolutionary and conservation of the *Bothrops jararaca* group. **Herpetologica**, v. 58, p. 303–312. 2002.

MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Old habits die hard: mouse handling by a pitviper species on a rodent-free island. **Amphibia-Reptilia**, v. 30, p .435–438. 2009.

MARQUES, O. A. V; ABE, A. S; MARTINS, M. 1998. **Estudo diagnóstico da diversidade de reptéis do Estado de São Paulo**. In: Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX, p. 27–38.

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

MARTINS, M.; MARQUES, O.A.V.; SAZIMA, I. **Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops***. In: SCHUETT, G.W.; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M.E.; GREENE, H.W. Biology of the Vipers. Eagle Mountain Publishing: p. 307–328. 2002.

MARTINS, M.; OLIVEIRA, M. E. Natural history of snakes in forests of the Manaus region, Central Amazonia, Brazil. **Herpetological Natural History**, v. 6, p. 78–150. 1998.

MARTINS, M.; SAWAYA R. J.; MARQUES, O. A. V. A first estimate of the population size of the critically endangered lancehead, *Bothrops insularis*. **South American Journal of Herpetology**, v. 3, p. 168–174. 2008.

MATAYOSHI, P. M.; SOUZA, P. M.; JUNIOR, R. S. F.; PRESTES, N. C. SANTOS, R. C. 2012. Avaliação ultrassonográfica da cavidade celomática de serpentes. **Veterinária e Zootecnia**, n. 19, v. 4, p. 448–459. 2012.

MELGAREJO, A. R. Criação e manejo de serpentes. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de laboratório: criação e experimentação.** Editora Fiocruz: p. 175–199. 2002.

MORGAN, K. N.; TROMBORG, C. T. Sources of stress in captivity. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, p. 262–302. 2007.

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

POPE, C. E.; GÓMEZ, M. C.; DRESSER, B. L. In vitro production and transfer of cat embryos in the 21st century. **Theriogenology**, v. 66, p. 59–7. 2006.

POUGH, F.H.; ANDREWS, R. M.; CADLE, J. E.; CRUMP, M. L.; SAVITZKY, A. H.; WELLS, K. D. **Chapter 7: Reproduction and life history**. In: POUGH, F. H.; ANDREWS, R. M.; CADLE, J. E.; CRUMP, M. L.; SAVITZKY, A. H.; WELLS, K. D. (Editores). Herpetology. New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 204–234 pp.1998.

RAYNAUD, A.; PIEAU, C. **Chapter 4: Embryonic development of genital system**. In: GANS, C., BILLET, F. (Editores). Biology of Reptilia. Vol. 15 Development B. John Wiley & Sons, Inc. pp.151–300.1985

ROCHA-BARBOSA, O.; LOGUERCIO, M.F.C; VASCONCELLOS, F. M.; LINS, G. A.; NOVELLI, I. A.; HOHL, L. S. L. **Reptilia**. In: EVANILDE, B. Biologia dos Vertebrados. Rio de Janeiro: Editora Roca, p. 142–174. 2015.

RONNE, J. Revelations of a boa breeder. **Reptiles**, v. 4, p. 24–43. 1996.

SALLES-OLIVEIRA, I.; MACHADO, T.; BANCI, K. R.S.; ALMEIDA-SANTOS, S. M; SILVA, M. J. J. Genetic variability, management, and conservation implications of the critically endangered Brazilian pitviper *Bothrops insularis*. **Ecol. Evol**, v. 10. p. 12870–12882. 2020.

SALOMÃO, M. G., W. WÜSTER, R. S. THORPE. MtDNA phylogeny of Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops* (Squamata: Serpentes: Viperidae). Kaupia: **Darmstädter Beiträgezur Naturgeschichte**, v. 8, p. 127–134. 1999.

SAZIMA, I. Natural history of the pitviper *Bothrops* jar*araca* in southeastern Brazil. In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE, JR., E. D. (Eds.). **Biology of the pitvipers**, p. 199–216. 1992.

SCHMIDTLER, J. F. Parthenogenetische Felseideshsen aus de Ost-Türkei. **Die Eidechse**, v. 8, p. 3–5. 1993.

SCHMIDTLER, J. F., EISELT, J.; DAREVSKY, I. S. Untersuchungen an Felseidechsen (Lacerta saxkola-Gruppe) in der östlichen Türkei: 3. Zwei neue parthenogenetische Arten. **Salamandra**, v. 30, p.55–70. 1994.

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, p. 210–252. 1987.

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

SHINE, R.; OLSSON, M. M.; MOORE, I. T.; LEMASTER, M. P.; MASON, R. T. Why do male snakes have longer tails than females?. **Proc. R. Soc. Lond. B.**, v. 266, p. 2147–2151. 1999.

TELEMECO, R. S. Sex Determination in Southern Alligator Lizards (*Elgaria multicarinata*; Anguidae). **Herpetologica**, v. 71, p. 8–11. 2015.

TRAVAGLIA-CARDOSO, S. **Estratégias reprodutivas de *Bothrops jararaca* (Serpente Viperidae)**. 2000. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; ZELANIS, A.; FURTADO, M. F. D. Sexual dimorphism in development and venom production of the insular threatened pit viper *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) of Queimada Grande Island, Brazil. **Journal of Threatened Taxa**, v. 10, n. 2, p. 1177–1184. 2010.

VALDECANTOS, S.; LOBO, F. First Report of Hemiclitores in Females of South American Liolaemid Lizards. **Journal of Herpetology**, v. 49, p. 291–294. 2015.

VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles**. Academic Press. 2013.

WHITTIER, J. M., CREWS, D. Ovarian development in red-sided garter snakes Thamnophis sirtalis parietalis: Relationship to mating. **General and comparative endocrinology**, v. 61, n. 1, p. 5–12. 1986.

WÜSTER, W.; DUARTE, M. R.; SALOMÃO, M. G. Morphological correlates of incipient arboreality and ornithophagy in island pitvipers, and the phylogenetic position of *Bothrops insularis*. **Journal of Zoology**, v. 266, p. 1–10. 2005.

ZELANIS, A. **Análise da variabilidade ontogenética do veneno de *Bothrops insularis* (Amaral, 1921) (Serpentes, Viperidae): implicações adaptativas aos itens alimentares**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2006.

ZELANIS, A.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; FURTADO, M. F. D. Ontogenetic changes in the venom of *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) and its biological implication. **South Am J Herpetol.**, v. 3, p. 43–50. 2008.

ZIEGLER, T., BÖHME, W. Genitalstrukturen und Paarungsbiologie bei squamaten Reptilien, speziell den Platynota, mit Bemerkungen zur Systematik. **Salamandra**, v. 8, p. 1–207. 1997.