



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Verônica Alberto Barros

Reprodução no gênero *Bothrops* (Serpentes, Viperidae)

São José do Rio Preto

2016

Verônica Alberto Barros

Reprodução no gênero *Bothrops* (Serpentes, Viperidae)

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadoras: CAPES e FAPESP – Proc.
2012/15037-4

Orientador: Prof^a. Dr^a. Selma Maria de Almeida
Santos

São José do Rio Preto

2016

Barros, Verônica Alberto.

Reprodução no gênero *Bothrops* (Serpentes, Viperidae) / Verônica Alberto Barros. – São José do Rio Preto, 2016
193 f.: il.

Orientador: Selma Maria de Almeida Santos

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Reprodução animal. 2. Cobra - Reprodução. 3. Jararaca (Cobra) - Reprodução. 4. *Bothrops* – Reprodução. 5. Espermatogênese em animais. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 598.12

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Verônica Alberto Barros

Reprodução no gênero *Bothrops* (Serpentes, Viperidae)

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Financiadoras CAPES e FAPESP – Proc. 2012/15037-4

Comissão Examinadora

Profª. Drª. Selma Maria de Almeida Santos
Instituto Butantan – São Paulo
Orientadora



Prof. Dr. Henrique Bartolomeu Pereira Braz
The University of Sidney- Australia



Profª. Drª. Ligia Pizzatto do Prado
University of Newcastle - New South Wales, Australia



Prof. Dr. Leonardo de Oliveira
Museu de Zoologia da USP - São Paulo

Prof. Dr. Phelipe Oliveira Favaron
USP – São Paulo



São José do Rio Preto
31 de agosto de 2016

*Às minhas filhas, Vitória e Manuela, que
são o melhor da minha vida e à minha mãe
Leila, por tanto me ajudar sempre.*

Agradecimentos

Aos curadores, gerentes, técnicos e a todos funcionários das coleções científicas onde realizei a coleta de dados para esta tese de doutorado: Dra. Glaucia Maria Funk Pontes (Museu de Ciência e Tecnologia, PUC -RS), Dr. Gustavo Graciolli, Thomas R. F. Sinani e Lílana Piatti (Universidade Federal do Mato Grosso do Sul), Dr. Guarino R. Colli e Ísis da Costa Arantes (Universidade de Brasília), Dra. Rejane Maria Lira da Silva e Daniela Pinto Coelho (Universidade Federal da Bahia), Dr. Paulo Passos e Pedro Henrique Moreira de Sousa Pinna (Museu Nacional). Muito obrigada aos curadores por permitirem a coleta de material para análise histológica, possibilitando assim a realização deste projeto de pesquisa.

Aos membros da banca titulares e suplentes, Dr. Otavio A. V. Marques, Dra. Ligia Pizzatto, Dr. Phelipe Oliveira Favaron, Dr. Leonardo de Oliveira, Dra. Rafaela Maria Moresco, Dra. Lívia Cristina dos Santos e Dr. Henrique Braz por aceitarem elaborar um parecer sobre esta tese no modelo de defesa não-presencial.

À CAPES e FAPESP (Processo 2012/15037-4) pelas bolsas recebidas durante o primeiro ano de doutorado.

À Dra. Selma Maria de Almeida Santos por todos esses anos de orientação desde a iniciação científica, agradeço por tudo que pude aprender com você desde que me deu a oportunidade de estágio no Instituto Butantan até hoje... mas além dos conhecimentos científicos também agradeço pelo seu apoio, paciência, confiança, compreensão e amizade, muito obrigada por tudo!

Ao Dr. Claudio Augusto Rojas, agradeço por tudo que venho aprendendo com você desde que iniciamos nossa parceria com o artigo sobre *Sibynomorphus mikanii*. Muito obrigada pela grande ajuda nos artigos (nesses da tese e em outros) em vários aspectos, com as análises histológicas, com as suas ideias, com a revisão dos textos, enfim, te agradeço muito por ter sido como um co-orientador informal nesse período e também um verdadeiro amigo!

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Freitas e à Seção Técnica de Pós-graduação da UNESP – Campus São José do Rio Preto, por todo apoio, inclusive à distância.

Ao Diretor do Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan, Dr. Otavio Augusto Vuolo Marques e à Selma M. Almeida-Santos agradeço pelo empréstimo de um microscópio que permitiu com que eu pudesse conciliar meu trabalho com a coleta de dados desta tese.

Aos pesquisadores do Instituto Butantan que gentilmente permitiram o uso de equipamentos, Dr. Carlos Jared e Dra. Marta Antoniazzi (Laboratório de Biologia Celular) e Dra. Diva D.S. Morena. Obrigada também à Naiara e Simone pela ajuda com as fotos no Laboratório de Biologia Celular.

À Ms. Karina Maria Pereira da Silva, por ter me ajudado a fotografar uma grande quantidade de lâminas para os artigos desta tese (inclusive por encontrar os espermatozoides no rim de *B. pubescens*!!!), e por colaborar com alguns capítulos desta tese como co- autora. Muito obrigada pela amizade, colaboração e ajuda! Sua ajuda foi fundamental, muito importante para este trabalho!

Ao Dr. Cristian Alexandro Gomes por toda ajuda com o Mesquite me ensinando a fazer as análises do Capítulo 7, muito obrigada pela sua paciência, disponibilidade e amizade!

A todos colegas e funcionários do Laboratório de Ecologia e Evolução e também da Coleção Científica do Instituto Butantan, especialmente à Dona Maria, Darina, Dona Vera, Valdir e Gileno.

Ao Laboratório VETPAT, onde foram confeccionadas a grande maioria das lâminas histológicas desta tese e à Dra. Leticia Ruiz Sueiro, por ter levado o material para processamento para histologia no Laboratório VETPAT muitas vezes!

Aos dirigentes do Ministério do Meio Ambiente que apoiaram a continuidade e conclusão do meu doutorado desde o início das minhas atividades neste órgão em 2013: Prof. Dr. Roberto Brandão Cavalcante (UNB, em sua gestão como Secretário de Biodiversidade e Florestas); Moara Menta Giasson, Sergio Henrique Collaço de Carvalho, Sergio Brant e Ana Paula Leite Prates (como diretoras e diretores do Departamento de Áreas Protegidas

- DAP); Andre Luís Lima, Nadinni Oliveira de M. Souza e Giovana Palazzi (como gerentes do DAP).

Um agradecimento especial ao Andre Luís Lima, meu chefe no MMA há quase três anos, por acreditar em mim, e consequentemente na conclusão desta tese, e com isto me liberar (muitas vezes!) para que pudesse coletar dados e principalmente para finalizar esta tese, muito obrigada por sua enorme paciência e compreensão comigo e com todos da equipe nessa e em outras situações!

Agradeço também aos colegas do DAP que me ajudaram neste período de diversas formas nesse período em Brasília, especialmente aqueles que passam (ou já passaram) dias inteiros convivendo comigo harmoniosamente na mesma baía: Luiz, Fábio, Tatagiba, Esther, Naninha, Sara, Erick, Marco, Erick e Jean! Ao Flavio, que dentre outras situações, me ajudou quando meu notebook quebrou bem agora nos últimos dias!

À minha família, sem a qual eu não conseguiria ter chegado até aqui. À minha mãe Leila, que é a melhor pessoa que eu conheço, e também a melhor mãe (e agora vó!) desse universo, muito obrigada por tudo mãe! Ao meu pai José e à minha irmã Lilian, que também sempre me apoiaram. À minha vó Olivia e ao meu vô Manoel (em memória) por tantos bons momentos que passamos juntos. Às minhas filhinhas, Manu e Vivi, que são minha alegria e também minha força para continuar nos momentos difíceis. Amo vocês!

A imaginação é mais importante que o conhecimento.

Albert Einstein

Sumário

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução Geral.....	3
Capítulo 1: Anatomia do trato reprodutivo, estocagem de esperma e plugs copulatórios nas fêmeas de jararacas-pintadas do grupo <i>Bothrops neuwiedi</i>	7
Capítulo 2: Ciclos espermatogênico, do segmento sexual renal e estocagem de esperma nos machos de <i>Bothrops pubescens</i> incluindo uma análise da relação dos eventos reprodutivos com o clima atual do sul do Brasil.....	38
Capítulo 3: First observation of sperm in the sexual segment of the kidney of a snake.....	67
Capítulo 4: Mating plugs and male sperm storage in <i>Bothrops cotiara</i> (Serpentes, Viperidae).....	76
Capítulo 5: Biologia reprodutiva de <i>Bothrops alternatus</i> do sul do Brasil.....	91
Capítulo 6: Machos de serpente com oviduto de fêmeas? Ocorrência de indivíduos intersexo em <i>Bothrops erythromelas</i> e <i>Bothrops moojeni</i>	115
Capítulo 7: Evolução das estratégias reprodutivas nas jararacas do gênero <i>Bothrops</i>	135
Conclusões.....	193

RESUMO

A reprodução é essencial para a perpetuação das espécies e por esta razão este é um tema central no estudo da biologia de qualquer animal. Nesta tese apresento dados inéditos sobre diversos aspectos reprodutivos de algumas espécies de jararacas, incluindo *B. cotiara*, *B. alternatus*, *B. pubescens*, *B. diporus*, *B. mattogrossensis*, *B. neuwiedi* e *B. pauloensis*. Além da caracterização de eventos reprodutivos como produção de gametas, estocagem de esperma e formação de plugs copulatórios, também descrevo pela primeira vez em serpentes a presença de esperma no segmento sexual renal de *B. pubescens* e a intersexualidade em *B. moojeni* e *B. erythromelas*. A influência dos fatores ambientais e da inércia filogenética sobre a determinação dos padrões reprodutivos nestas serpentes foi avaliada por meio de (1) comparações entre a época de ocorrência dos eventos reprodutivos entre as diferentes espécies que indicaram a influência de ambos os fatores; (2) reconstruções de caráter ancestral que apontaram para um forte conservatismo filogenético em relação ao dimorfismo sexual e alta variabilidade em relação ao padrão de maturidade sexual; (3) análises estatísticas cujos resultados indicam que não há relação entre o aumento de parâmetros como temperatura e pluviosidade e o ciclo dos machos de *B. pubescens*, espécie utilizada como modelo. Embora a predominância de eventos de acasalamento durante o outono e nascimentos no verão indique um forte componente filogenético na determinação dos eventos reprodutivos desse gênero, os fatores ambientais podem influenciar a existência de variação interespecífica especialmente em relação à plasticidade das épocas de ovulação, prenhez e das estratégias de estocagem de esperma.

Palavras-chave: *ciclos reprodutivos, estocagem de esperma, plugs copulatórios, espermatogênese, segmento sexual renal, ducto deferente, intersexualidade*

ABSTRACT

Reproduction is essential for the perpetuation of any species. That is why it is a central theme for studies on the biology of any organism. Here, I present new data on several aspects of reproduction for Bothrops species, including B. cotiara, B. alternatus, B. pubescens, B. diporus, B. mattogrossensis, B. neuwiedi and B. pauloensis. The characterization of reproductive events such as gametogenesis, sperm storage, formation of mating plugs and activity of the sexual segment of the kidneys (SSK) is provided. I also describe the presence of sperm inside the SSK for the first time in a snake species and intersexuality in B. moojeni and B. erythromelas. I evaluated the influence of environmental factors and phylogenetic inertia in the determination of reproductive events in these snakes by (1) a comparison of the timing of reproductive events between species which indicates that both factors may be important, (2) ancestral character state reconstructions showing a strong phylogenetic conservatism in sexual dimorphism with females being the larger sex and high variability in sexual maturity between species, (3) statistical analysis indicating that male reproductive variables do not vary according to temperature and rain in B. pubescens. Although there are many observations of reproductive events outside the expected periods for Bothrops species (mainly for timing of ovulation, pregnancy and sperm storage strategies), reports of mating and births are concentrated in autumn and summer, respectively, showing that although phylogenetic inertia has a high influence on the conserved timing of these reproductive events in Bothrops, environmental factors may also play a role in the plasticity observed in some species and individuals.

Keywords: reproductive cycles, sperm storage, mating plugs, spermatogenesis, sexual segment of the kidneys, ductus deferens, intersexuality

Introdução geral

A reprodução é essencial para a perpetuação das espécies e por esta razão este é um tema central no estudo da biologia de qualquer animal. As jararacas do gênero *Bothrops* são o grupo de serpentes peçonhentas com maior número de espécies na região neotropical, ocupando diversos tipos de ambiente (Campbell & Lamar, 2004, Carrasco et al, 2012). Estas serpentes da Família Viperidae possuem grande importância para a saúde pública, pois algumas espécies são responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos no Brasil (Araújo et al., 2003, Lima et al. 2009, Wen et al., 2015). Por outro lado, o gênero *Bothrops* também inclui espécies raras e/ou ameaçadas de extinção. Desta forma, o conhecimento sobre a reprodução é importante para o manejo destas espécies, tanto para fins de conservação, quanto para questões associadas à saúde pública (manutenção de serpentes em cativeiro para extração de veneno e produção de soro anti-ofídico para as vítimas de acidentes).

O objetivo deste trabalho é apresentar novas informações sobre aspectos reprodutivos para algumas espécies do gênero *Bothrops*, incluindo a análise de ciclos reprodutivos de machos e fêmeas, estocagem de esperma e plugs copulatórios, além de investigar a influência da inércia filogenética e das condições ambientais sobre os padrões reprodutivos nesse gênero. Para tanto, foram organizados sete manuscritos (capítulos) que tratam destes temas.

No primeiro capítulo “Anatomia do trato reprodutivo, estocagem de esperma e plugs copulatórios nas fêmeas de jararacas-pintadas do grupo *Bothrops neuwiedi*”, descrevo a anatomia macroscópica e microscópica do oviduto de seis espécies deste grupo: *B. marmoratus*, *B. neuwiedi*, *B. pauloensis*, *B. pubescens*, *B. mattogrossensis* e *B.*

diporus e apresento dados sobre a estocagem de esperma e os plugs copulatórios no contexto do ciclo reprodutivo das espécies.

No segundo capítulo “Ciclos espermatogênico, do segmento sexual renal e estocagem de esperma nos machos de *Bothrops pubescens* incluindo uma análise da relação dos eventos reprodutivos com o clima atual do sul do Brasil”, além de realizar uma caracterização detalhada dos eventos reprodutivos nos machos desta espécie, procurei também utilizar *B. pubescens*, espécie para qual pude obter uma boa amostragem de machos, como modelo para um teste da relação entre os padrões de temperatura e pluviosidade, espermatogênese e hipertrofia do segmento sexual renal.

No terceiro capítulo “*First observation of sperm in the sexual segment of the kidney of a snake*”, apresento um relato inédito da presença de esperma no rim de *B. pubescens* e discuto algumas hipóteses que merecem ser mais bem investigadas a partir deste achado.

Já o quarto capítulo “*Mating plugs and male sperm storage in Bothrops cotiara (Serpentes, Viperidae)*” trata-se de um manuscrito onde é relatada pela primeira vez a presença de plugs copulatórios em *B. cotiara* e também a estocagem de esperma no epididímo dos machos.

No quinto capítulo “*Biologia reprodutiva de Bothrops alternatus do sul do Brasil*” apresento dados inéditos sobre a reprodução dessa espécie, que também inclui a estratégia dos plugs copulatórios.

O sexto capítulo “*Machos de serpente com oviduto de fêmeas? Ocorrência de indivíduos intersexo em Bothrops erythromelas e Bothrops moojeni*” aborda a descrição da anatomia macroscópica e microscópica do trato reprodutivo destes intersexos e

compara as características dos ovidutos dos intersexos com ovidutos de fêmeas sexualmente maduras.

Por fim, no sétimo e último capítulo “Evolução das estratégias reprodutivas nas jararacas do gênero *Bothrops*” apresento uma revisão sobre a reprodução no gênero *Bothrops*, abordando de forma comparativa diversos aspectos da biologia reprodutiva incluindo ciclos reprodutivos, maturidade e dimorfismo sexual e parâmetros de fecundidade.

Referências

- Araújo, F.A.A., Santalúcia, M. e Cabral, R.F. 2003. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. pp 6-12. In *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Cardoso et al. (orgs.) Sarvier: São Paulo.
- Campbell, J.A. e Lamar, W.W. 2004. *The venomous reptiles of the Western Hemisphere*. Ithaca and London, Cornell University Press.
- Carrasco, P.A., Mattoni, C.I., Leynaud, G.C. & Scrocchi, G.J. 2012. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologica Scripta* 41: 109-124.
- Lima, A.C.S.F., Campos, C.E.C., Ribeiro, J.R. 2009. Epidemiological profile of snake poisoning accidents in the State of Amapá. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42: 329-335.
- Wen, F. H., Monteiro, W. M., Silva, A. M. M., Tambourgi, D. V., Silva, I. M., Sampaio, V. S., Santos, M. C., Sachett, J., Ferreira, L. C. L., Kalil, J., Lacerda, M. 2015. Snakebites and scorpion stings in the Brazilian Amazon: Identifying research priorities for a largely neglected problem. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (5) :e0003701.doi:10.1371/journal.pntd.0003701.

Capítulo 1

Anatomia do trato reprodutivo, estocagem de esperma e
plugs copulatórios nas fêmeas de jararacas-pintadas do
grupo *Bothrops neuwiedi*

Manuscrito para o periódico Acta Zoologica

Resumo

Neste estudo descrevemos a anatomia macroscópica e microscópica do oviduto de fêmeas de seis espécies do grupo *Bothrops neuwiedi*. Assim como para outras serpentes, o oviduto pode ser dividido em vagina, junção útero-vaginal (JUV), útero e infundíbulo (anterior e posterior). Esperma foi observado em todas estas porções inclusive dentro de receptáculos de esperma no infundíbulo. Um plug copulatório foi observado na vagina de *B. marmoratus*, *B. matogrossensis*, *B. neuwiedi* e *B. pauloensis*. Esperma estocado na JUV foi encontrado com maior frequência na presença da contorção muscular uterina (UMT). Espécies de regiões com altas temperaturas ao longo do ano apresentaram variações no *timing* dos ciclos reprodutivos (e.g. ovulação a partir de julho, “inverno”) em relação ao padrão do gênero *Bothrops*.

Palavras chaves: *B. marmoratus*, *B. diporus*, *B. matogrossensis*, *B. pubescens*, *B. pauloensis*, *B. neuwiedi*, anatomia, oviduto, junção útero-vaginal (JUV), contorção muscular uterina (“UMT”), receptáculos de esperma, infundíbulo

Introdução

O conhecimento sobre a anatomia macroscópica e microscópica do trato reprodutivo das serpentes é fundamental para o entendimento dos ciclos reprodutivos destes animais (Almeida-Santos et al., 2014). Para as fêmeas, a análise microscópica do oviduto pode revelar dados importantes para a compreensão dos ciclos reprodutivos, como a estocagem de esperma (Fox, 1956, Halpert et al., 1982, Siegel et al., 2011, Barros et

al., 2012, 2014, Rojas et al., 2015). A estocagem de esperma é considerada um componente obrigatório do ciclo reprodutivo dos viperídeos da região neotropical, em função da dissociação entre a cópula (outono) e a ovulação (primavera) (Almeida-Santos e Salomão, 2002). A estocagem confirmada pela presença de esperma no trato reprodutivo já foi relatada para algumas serpentes da região neotropical (e.g. Almeida-Santos e Salomão, 1997, Barros et al., 2012, Resende e Nascimento, 2015, Rojas et al., 2015). Embora os estudos com estocagem de esperma em serpentes da região neotropical ainda estejam no início, para as serpentes de regiões temperadas já há dados sobre a relação da estocagem de esperma com os mecanismos de competição espermática (cf. Birkhead e Moller, 1993, Olsson e Madsen, 1998) e múltipla paternidade (Schwartz et al., 1989, Hoggren e Tegelstrom, 1995).

Outro componente importante do ciclo reprodutivo que pode ser descoberto através da análise microscópica do oviduto é o plug copulatório (Capítulos 2 e 5 desta tese). Estes plugs copulatórios são formados por secreções do segmento sexual renal dos machos e depositados na vagina das fêmeas durante a cópula (Crews & Garstka, 1982; Aldridge et al., 2011, Friesen et al., 2013). Dentre as funções propostas para os plugs copulatórios em Squamata podemos citar a função de tampão copulatório (impedir a perda de esperma), guarda sexual passiva das fêmeas (fêmeas apresentam decréscimo na atratividade na presença do plug) e espermatóforo (Shine et al., 2000, Moreira & Birkhead, 2004, Friesen et al., 2013). Para as serpentes do gênero *Bothrops*, há o relato de ocorrência do plug em algumas espécies (*B. cotiara* (Capítulo 4), *B. alternatus* (Capítulo 5), *B. jararacussu* (obs. pess.), *B. moojeni* (obs. pess.), porém não foram realizados ainda testes de hipóteses sobre sua função (cf. Moreira & Birkhead, 2003, 2004, Moreira et al.,

2006, 2007). Neste estudo relatamos a ocorrência do plug copulatório em mais quatro espécies do grupo *B. neuwiedi*.

O grupo *B. neuwiedi* é composto por oito espécies de serpentes do gênero *Bothrops* (*B. neuwiedi*, *B. erythromelas*, *B. pubescens*, *B. marmoratus*, *B. mattogrossensis*, *B. diporus*, *B. pauloensis* e *B. lutzi*), que se encontram distribuídas pelos biomas de formação aberta da América do Sul, como Pampas, Cerrado, Caatinga e Pantanal (Wüster et al., 2002, Silva e Rodrigues, 2008, Machado et al., 2014). Uma análise das relações filogenéticas das espécies do grupo *B. neuwiedi* demonstrou que este é um grupo monofilético (Machado et al. 2014). As análises de Machado et al. (2014) indicam que o ancestral comum mais recente das jararacas data da metade do Mioceno, enquanto a divergência entre o grupo *B. neuwiedi* e seu grupo-irmão *B. jararaca* ocorreu no final do Mioceno. A origem do grupo *B. neuwiedi* sofreu influência de eventos que ocorreram durante o Neogeno, como por exemplo, o soerguimento final do Planalto Central Brasileiro no Plioceno (Werneck, 2011), enquanto as flutuações climáticas do Quaternário tiveram um papel na diversificação dentro do grupo *B. neuwiedi* (Machado et al., 2014). Portanto, trata-se de um grupo interessante para estudo comparado da anatomia e dos ciclos reprodutivos por ser um grupo cuja especiação é recente.

Diversos estudos que incluem dados sobre a biologia das espécies de serpentes do grupo *B. neuwiedi* já foram conduzidos, incluindo estudos sobre aspectos da história natural (*B. pauloensis*, Valdujo et al., 2002; *B. mattogrossensis*, Monteiro et al., 2006, *B. diporus*, Giraudo et al., 2008; *B. neuwiedi*, Travaglia-Cardoso, 2011) e dentre estes, alguns estudos que tratam especificamente da reprodução de algumas espécies (*B. pubescens*, Hartmann et al., 2004, Capítulo 2 desta tese, , *B. erythromelas*, Barros et al., 2014, Reis et al., 2015). Por outro lado, considerando que para a compreensão dos ciclos reprodutivos

de serpentes, a utilização de técnicas de microscopia é essencial tanto para compreender o papel da estocagem de esperma no ciclo reprodutivo das fêmeas (Rojas et al., 2015, Barros et al., 2014a,b), quanto para definir corretamente o estágio reprodutivo dos machos (Mathies, 2011, Rojas et al., 2013, Almeida-Santos et al., 2014), pode-se considerar que a reprodução é um aspecto pouco conhecido da biologia das espécies do grupo *B. neuwiedi*. O objetivo deste estudo é apresentar novos dados sobre a reprodução das fêmeas de espécies do grupo *B. neuwiedi*. Com base na análise macroscópica e microscópica do trato reprodutivo das fêmeas, nós descrevemos a anatomia do trato reprodutivo, com ênfase no oviduto e nos relatos de estocagem de esperma na junção útero-vaginal e infundíbulo, presença de esperma na vagina e útero e por fim, na descoberta de plugs copulatórios na vagina para espécies desse grupo. Esses dados são interpretados no contexto do ciclo reprodutivo das espécies amostradas: *B. neuwiedi*, *B. marmoratus*, *B. diporus*, *B. mattogrossensis*, *B. pauloensis* e *B. pubescens*.

Material e Métodos

Amostragem de espécies

Foi amostrado um total de 72 fêmeas pertencentes a seis espécies do grupo *B. neuwiedi*, depositadas nas seguintes coleções científicas: Museu de Ciência e Tecnologia (MCT) da Pontifícia Universidade Católica (PUC) do Rio Grande do Sul, Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (UNB), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) e Museu Nacional do Rio de Janeiro (MN). As espécies foram agrupadas de acordo com Silva e Rodrigues (2008). A amostragem de cada espécie foi realizada de acordo com a

disponibilidade para coleta de fragmentos dos órgãos para histologia, conforme descrito abaixo:

- *B. mattogrossensis*: 12 fêmeas, coletadas no Pantanal, estado do Mato Grosso do Sul;
- *B. diporus*: três fêmeas dos Pampas no Rio Grande do Sul;
- *B. pubescens*: 19 fêmeas dos Pampas e áreas limítrofes com a Mata Atlântica no Rio Grande do Sul;
- *B. marmoratus*: 11 fêmeas provenientes do cerrado da região Central do Brasil, do estado de Goiás e do Distrito Federal.
- *B. pauloensis*: 15 fêmeas do Cerrado e Pantanal. Em função da distância dos pontos amostrados, os dados foram analisados de acordo com as populações:
 - População A: seis fêmeas do Cerrado da região sudeste do Brasil, estado de São Paulo;
 - População B: 4 fêmeas do Cerrado da região central do Brasil, estados de Goiás, Tocantins e o Distrito Federal;
 - População C: 2 fêmeas do Pantanal, estados do Mato Grosso do Sul e Mato Grosso

- População D: 2 fêmeas de Pimenta Bueno, RO
- *B. neuwiedi*: 12 fêmeas coletadas na Reserva Particular do Patrimônio Natural Serra do Caraça e adjacências em Minas Gerais.

Coleta e análise de dados

Após o registro do comprimento rostro-cloacal com auxílio de fita métrica de acurácia de 10 mm, a dissecação ventral das fêmeas foi realizada para exame das gônadas e vias genitais. Para as fêmeas, com auxílio de paquímetro digital (precisão 0,1 mm) foi registrado o diâmetro do maior folículo ovariano ou a presença de embriões no oviduto. A presença/ausência de contração muscular uterina (UMT – *uterine muscular twisting*) na junção útero-vaginal (JUV) e presença de corpo lúteo nos ovários também foram registradas. Em seguida, foi coletado um fragmento de cada região do oviduto (infundíbulo anterior e posterior, útero, junção útero-vaginal e vagina) (Rojas et al., 2015) para análise histológica. O ciclo reprodutivo das fêmeas foi caracterizado pela distribuição do maior folículo ovariano ou presença de embriões nos ovidutos ao longo do ano, presença de espermatozoides e do plug copulatório no trato reprodutivo da fêmea.

Foram utilizados neste estudo apenas indivíduos sexualmente maduros. O critério para as fêmeas serem consideradas sexualmente maduras foi apresentar qualquer uma dessas características: ovário com folículos em vitelogênese secundária, embriões no oviduto, ou presença de marcas de corpo lúteo nos ovários, como indicativo de que esta fêmea já teve um ciclo reprodutivo anterior ao momento de coleta. Todos os órgãos coletados para análises histológicas foram preservados em álcool a 70% e processados

pelo método de parafina. Foram obtidos cortes de 5 μ m de espessura e a coloração Hematoxilina-Eosina (H/E) foi utilizada para estudo dos tecidos.

Resultados

Anatomia do trato reprodutivo

O trato reprodutivo das fêmeas é composto por dois ovários e respectivos ovidutos, localizados nas regiões laterais do corpo da serpente. Como outros órgãos do corpo da serpente, os ovários apresentam um formato alongado. Os folículos ovarianos podem ser vistos a olho nú e encontram-se enfileirados ao longo da extensão do órgão (Fig. 1A, B, C). Na maioria das fêmeas amostradas há apenas folículos ovarianos de menor tamanho, considerados como folículos em vitelogênese primária (Fig. 1A, B, C). Com a deposição de vitelo, os folículos aumentam de tamanho e passam a ser chamados de folículos em vitelogênese secundária. Os ovários e ovidutos tem início em diferentes porções do corpo do animal: o ovário direito está localizado em uma posição cranial em relação ao ovário esquerdo, e da mesma forma o oviduto direito tem início em uma posição mais cranial que o esquerdo (Fig. 1A).

O oviduto é o órgão onde ocorre a estocagem de esperma, fertilização e prenhez e pode ser dividido em diferentes partes. Para as espécies do grupo *B. neuwiedi*, podemos aplicar a divisão do oviduto nas partes propostas por Rojas et al. (2015) em infundíbulo anterior e posterior, útero, junção útero-vaginal (JUV) e vagina (Fig. 1A). A porção anterior do infundíbulo é constituída por um tecido bastante fino, de aspecto macroscópico translúcido (Fig. 1B). Essa porção do oviduto recebe os folículos ovarianos durante a

ovulação. Microscopicamente, a parede do infundíbulo anterior é mais fina e apresenta muitas invaginações. Não há presença de glândulas nesta porção (Fig. 2A). O epitélio é do tipo cuboidal simples com células ciliadas e poucas células secretoras. Já a porção posterior do infundíbulo apresenta uma série de dobras visíveis macroscopicamente (Fig. 1B). Microscopicamente pode ser observada a presença de glândulas tubulares simples, que são os receptáculos de estocagem de esperma (Figs. 2B, 8 A, B).

Após o infundíbulo posterior, tem início a porção mais longa do oviduto, o útero, onde ocorre a gestação dos embriões (Fig. 1A). O epitélio é do tipo cuboidal simples com células ciliadas e algumas células secretoras. As glândulas uterinas podem ser observadas na lâmina própria do útero (Fig. 2C). As glândulas uterinas são diferentes das glândulas do infundíbulo. As glândulas uterinas são formadas principalmente por células secretoras, enquanto no infundíbulo há presença abundante de células ciliadas nas glândulas (Fig. 2B). O útero termina na porção caudal do corpo da serpente.

A JUV faz a ligação entre o útero e a vagina (Fig 1. A, D, E). A JUV diferencia-se do útero principalmente pela ausência de glândulas nessa região (Fig. 2E). Além disso, não ocorre implantação de embriões na região da JUV. A JUV é um sítio de estocagem de esperma, nesta porção é observada a UMT (Fig. 1E, 8D). O epitélio pseudoestratificado apresenta sulcos profundos e é composto por células ciliadas e secretoras. Há duas camadas musculares nesta porção do oviduto, uma externa circular e a outra interna longitudinal (Fig. 1E). A vagina é a porção terminal do oviduto. A vagina é bifurcada e proporcionalmente mais larga que o restante do oviduto, em cada lado apresentando o formato de uma “bolsa” (Fig. 1 A, D,E). Estas “bolsas vaginais” são estruturas independentes e separadas na maior parte das fêmeas do grupo *B. neuwiedi* amostradas, porém em algumas fêmeas de *B. marmoratus* as “bolsas vaginais” estão fundidas

macroscopicamente (Fig. 1A, D). Em *B. pubescens*, foi observada a formação de criptas com formato de glândulas tubulares na porção inicial da vagina, logo após a JUV (Fig. 2 F). Em direção caudal, na porção mais alargada da vagina observa-se o aumento do lúmen (com presença ou vestígios de plug gelatinoso em algumas fêmeas) e a presença de epitélio colunar alto com muitas células secretoras e algumas ciliadas (Fig. 8E).

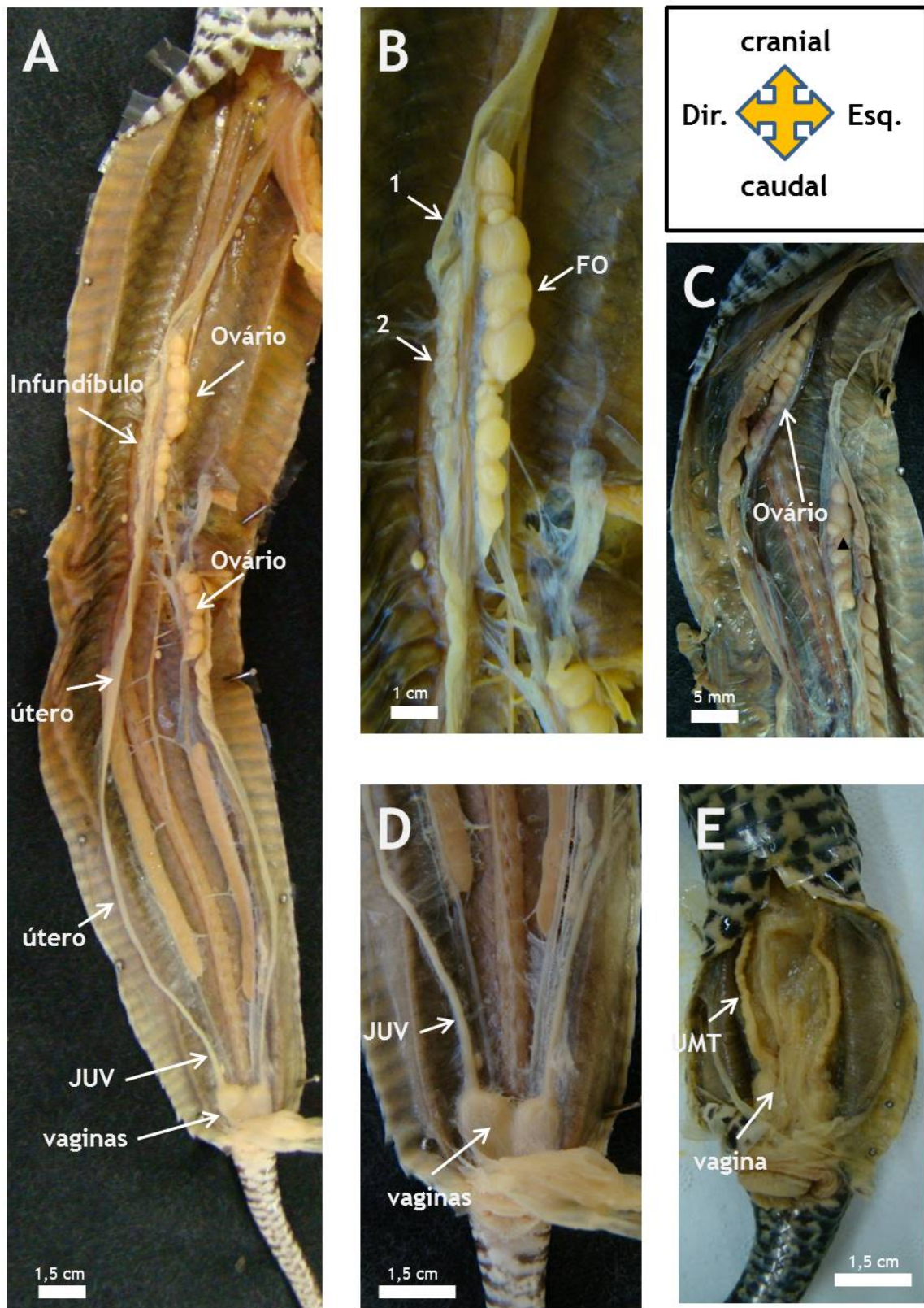


Figura 1: Anatomia do trato reprodutivo de fêmeas de serpentes do grupo *B. neuwiedi*. **A.** Visão geral do trato reprodutivo de uma fêmea de *B. marmoratus*, com as diferentes partes do oviduto. **B.** Detalhe da região do infundíbulo. 1: infundíbulo anterior, 2: infundíbulo posterior, FO: folículos ovarianos. **C.** Região do infundíbulo em uma fêmea do grupo *B. neuwiedi* com marcas de corpo lúteo (cabeça de seta) nos ovários. **D.** Detalhe da região da junção útero-vaginal (JUV) e da vagina em *B. marmoratus*, note a fusão das vaginas direita e esquerda. **E.** “Uterine muscular twisting” (UMT) na JUV de fêmea do grupo *B. neuwiedi*.

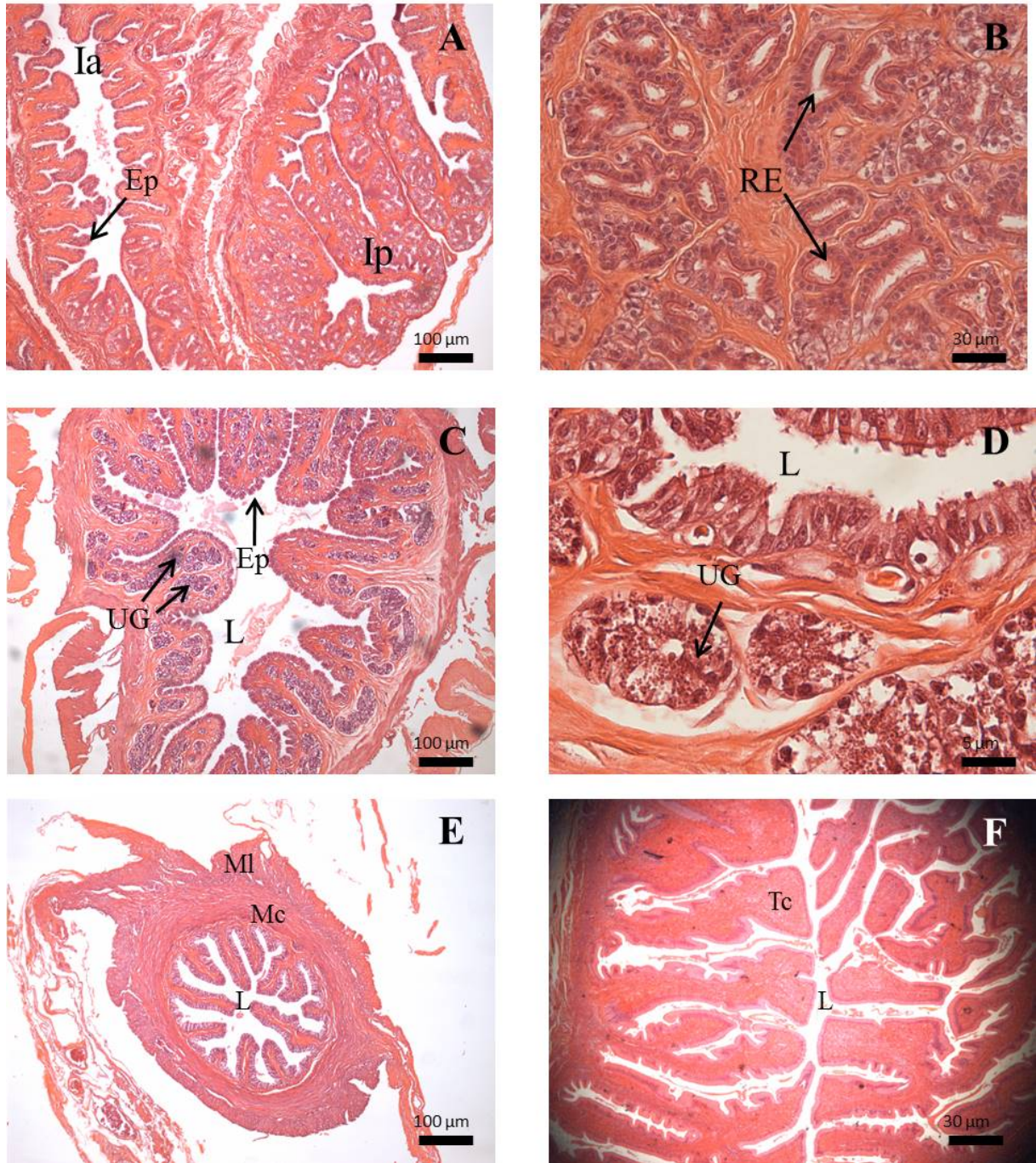


Figura 2: Anatomia microscópica das diferentes regiões do oviduto das jararacas-pintadas do grupo *Bothrops neuwiedi*. **A.** Divisão entre as porções anterior e posterior do infundíbulo. Note a ausência de glândulas no infundíbulo anterior e a presença abundante de glândulas no infundíbulo posterior. **B.** Detalhes das glândulas do infundíbulo posterior que funcionam como receptáculos de esperma. **C.** Corte transversal do útero mostrando a presença de inúmeras glândulas uterinas. **D.** Maior aumento da glândula uterina, evidenciando a presença de células secretoras. **E.** Junção útero-vaginal (JUV). **F.** Porção anterior da vagina com formação de criptas em formato de glândulas tubulares. Todas as fotos são do oviduto de fêmeas de *B. pubescens*.

Estocagem de esperma e plugs copulatórios no contexto dos ciclos reprodutivos

1.) *Bothrops mattogrossensis*

O período de vitelogênese secundária foi observado entre Maio (outono) e agosto (inverno) (Fig. 3). Fêmeas com vestígios de plug gelatinoso na vagina também foram observadas neste período. Em junho (outono), a análise histológica da vagina mostrou traços do plug em uma fêmea em vitelogênese secundária, sem a presença de UMT na JUV (UFMS 1354). Já em agosto (inverno), um pouco de plug foi observado na vagina de uma fêmea que apresentava embriões nos ovidutos (cinco embriões no oviduto direito e três no esquerdo) e presença de UMT na JUV simultaneamente (UFMS 1352). Os embriões já estavam visíveis a olho nu, porém ainda com a presença de grande quantidade de vitelo. Ainda em agosto, outra fêmea (UFMS 1346) em vitelogênese secundária e com UMT pouco evidente na JUV, apresentou presença de esperma no útero (Figs. 3, 8C).

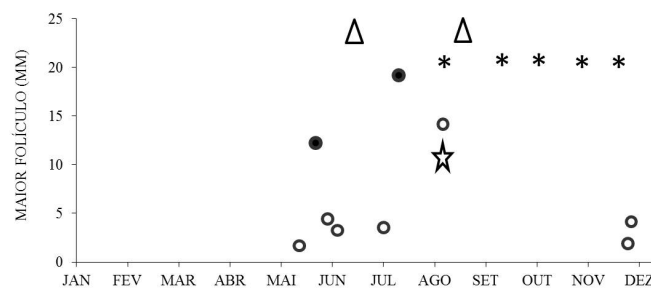


Figura 3: Ciclo reprodutivo das fêmeas de *Bothrops mattogrossensis*. Os círculos representam folículos ovarianos: os círculos vazios representam indivíduos que não tem UMT e os círculos cheios representam as fêmeas com UMT na JUV. Os triângulos indicam a presença de fêmeas com vestígios de plug gelatinoso na vagina e a estrela indica uma fêmea que apresentou a presença de esperma no útero. Os asteriscos representam fêmeas com embriões nos ovidutos. As observações de fêmeas com embriões nos ovidutos entre agosto e setembro são descritas neste estudo e as observações de outubro a dezembro estão descritas em Monteiro et al. (2006).

2.) *Bothrops diporus*

As três fêmeas de *B. diporus* amostradas foram coletadas durante o verão, nos meses de janeiro e março. As duas fêmeas coletadas em janeiro apresentavam folículos em vitelogênese primária e não foi encontrado esperma em nenhuma região do oviduto destes indivíduos. A fêmea coletada em março apresentava folículos no início da vitelogênese secundária (diâmetro do maior folículo = 9.97 mm) e espermatozoides estocados na JUV, onde havia a formação de UMT.

3.) *Bothrops pubescens*

Fêmeas com folículos ovarianos em estágio de vitelogênese primária foram observadas ao longo de todo ano (Fig. 4). A contração muscular uterina (UMT) foi observada em três fêmeas, duas destas em vitelogênese primária e uma em vitelogênese secundária. Espermatozoides não foram observados na UMT e nem nas demais partes do oviduto. Embriões em estágio inicial de desenvolvimento foram observados em novembro e dezembro (Fig. 4).

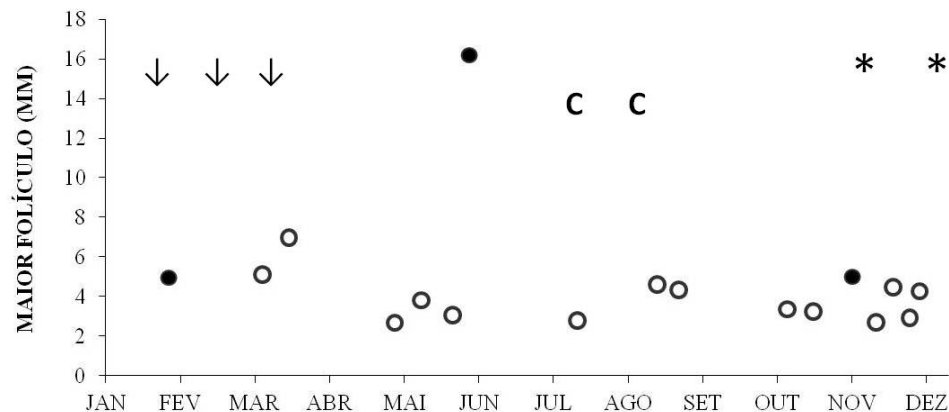


Figura 4: Ciclo reprodutivo das fêmeas de *Bothrops pubescens*. Os círculos pretos representam o tamanho do maior folículo ovariano de fêmeas que apresentavam UMT no útero posterior. Os folículos das fêmeas que não apresentavam UMT estão representadas por círculos brancos. Os asteriscos representam fêmeas com embriões nos ovidutos em estágio inicial de desenvolvimento, onde apenas o vitelo pode ser visualizado macroscopicamente. As setas indicam o período em que os nascimentos foram observados em cativeiro, e a letra C indica o período em que a cópula foi observada em cativeiro de acordo com Hartmann et al (2004).

4.) *Bothrops marmoratus*

A vitelogênese secundária foi observada durante o mês de março, entre o final do verão e o início do outono (Fig. 5). A presença de espermatozoides também foi observada nesta época, tanto na vagina de uma fêmea (Fig. 8F) (UNB 59524), com folículos ovarianos no início da fase de vitelogênese secundária (diâmetro do maior folículo: 7,39), quanto no infundíbulo posterior e na JUV de outro exemplar (UNB 59529) que apresentava folículos em vitelogênese secundária maiores (diâmetro do maior folículo: 12,48). O esperma no infundíbulo foi observado no lúmen (Fig. 8A) e dentro de glândulas que são receptáculos de esperma (Fig. 8B). Uma fêmea (UNB 53313) coletada em janeiro (verão) apresentou a presença de um plug gelatinoso na vagina. Os folículos ovarianos desta fêmea estavam em vitelogênese primária. Nenhuma fêmea de *B. marmoratus* amostrada apresentou UMT na JUV.

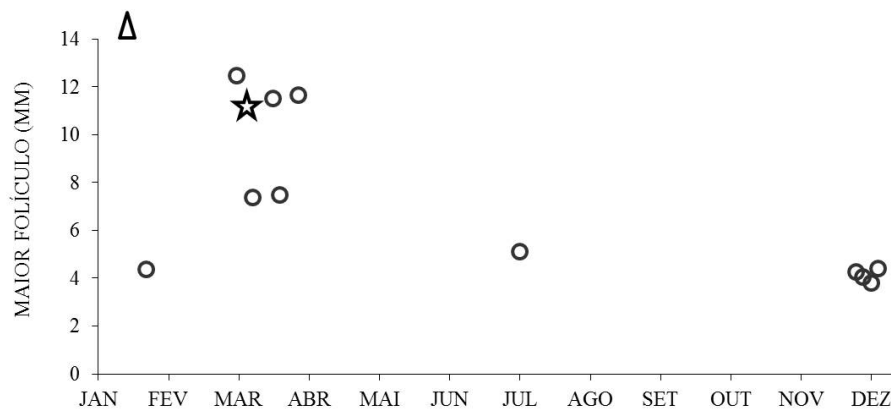


Figura 5: Ciclo reprodutivo das fêmeas de *Bothrops marmoratus*. Os círculos representam folículos ovarianos. O triângulo indica a presença de uma fêmea com plug gelatinoso na vagina e a estrela indica a presença de esperma na vagina e JUV neste período.

5.) *Bothrops pauloensis*

Apenas uma fêmea de *B. pauloensis* da cidade de Brasília, no DF (Brasil Central) apresentava folículos vitelogênicos em fevereiro (verão) na amostra deste estudo. Três fêmeas de duas populações diferentes, todas com folículos em vitelogênese primária apresentavam plug gelatinoso na vagina em diferentes estações: uma fêmea (UFMS 1342) de Aquidauna (MS) foi coletada em maio (outono), enquanto as fêmeas (MN 22746 e MN 22753) provenientes do estado de SP foram coletadas no final de outubro e início de dezembro (primavera). Não foi observada UMT na JUV de nenhuma fêmea amostrada. Embriões em estágio inicial de desenvolvimento foram observados durante o inverno (julho e agosto) em fêmeas das populações do Brasil Central e dos relictos de savana na Amazônia em Roraima. Na população de SP, uma fêmea apresentou embriões em estágio inicial de desenvolvimento no final de novembro (primavera) (Fig. 6).

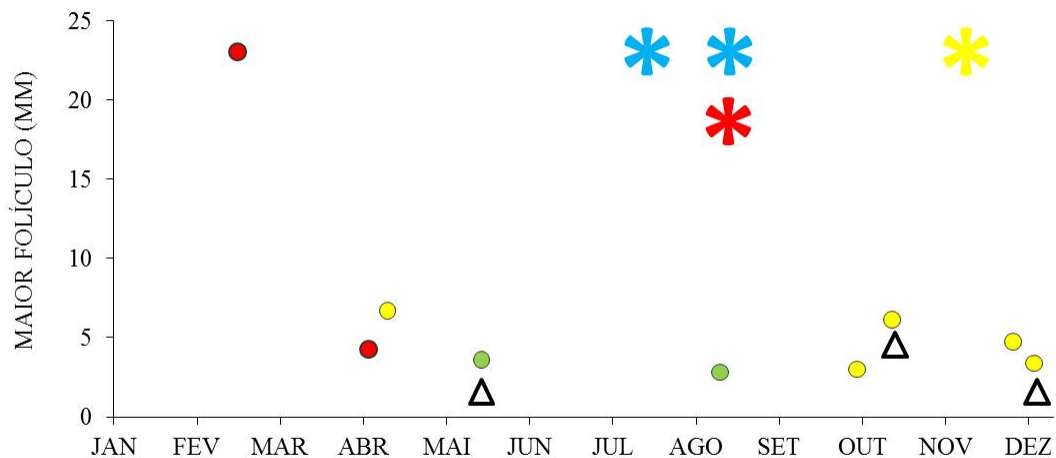


Figura 6: Ciclo reprodutivo das fêmeas de *Bothrops pauloensis*. Os círculos representam folículos ovarianos, os triângulos apontam as fêmeas que apresentaram plug gelatinoso na vagina e os asteriscos representam fêmeas com embriões em estágio inicial de desenvolvimento (com muito vitelo visível) nos ovidutos. Cada cor representa indivíduos de uma população: vermelho – Brasil Central (GO, DF, TO), amarelo – Sudeste (SP), verde – Pantanal (MS), azul – áreas savânicas na Amazônia (RO).

6.) *Bothrops neuwiedi*

Folículos vitelogênicos foram observados entre fevereiro e março (final do verão – início do outono). Quatro fêmeas com presença de UMT na JUV foram observadas entre dezembro e março. Dentre estas, uma fêmea coletada na metade do mês de março (final do verão) (MN 18930) apresentou grande quantidade de esperma na UMT (Fig. 8 D). Esperma também foi encontrado na JUV de uma fêmea (MN 21531) coletada no início de fevereiro (verão) que apresentava aspecto liso sem a presença de sinais da UMT. O plug gelatinoso (Fig. 8E) foi observado na vagina de duas fêmeas, uma delas com a presença de UMT (MN 19339) foi coletada em março, e a outra, sem a presença de UMT, foi coletada em dezembro (MN 21098) (Fig. 7).

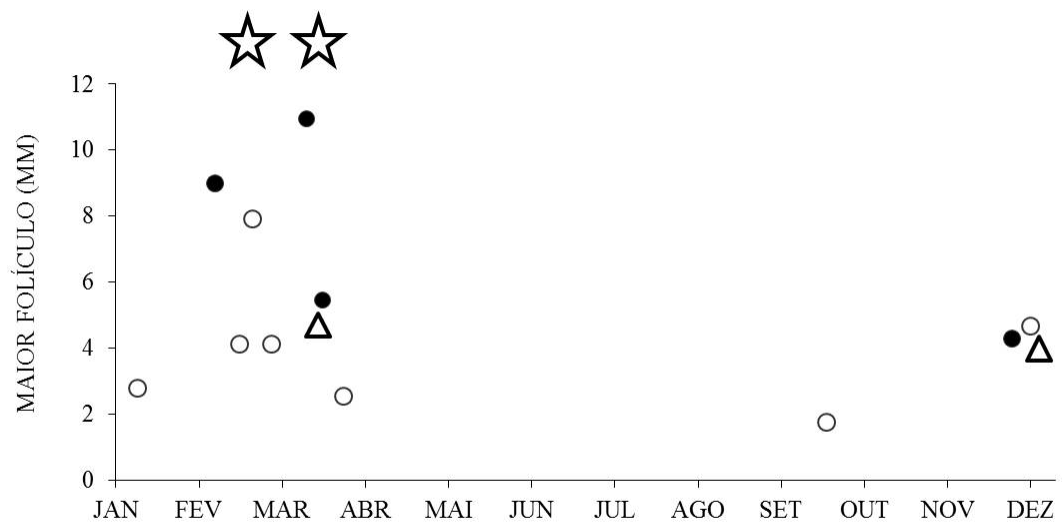


Figura 7: Ciclo reprodutivo das fêmeas de *Bothrops neuwiedi* de Minas Gerais, a maior parte das fêmeas é proveniente da RRPN Serra do Caraça. Os círculos representam os folículos ovarianos, os círculos vazios representam fêmeas com JUV sem UMT e os círculos pretos representam fêmeas com UMT na JUV. Os triângulos apontam para as fêmeas que apresentaram plug gelatinoso na vagina e as estrelas marcam a época em que foi encontrado espermatozoides na JUV de duas fêmeas, uma com e outra sem a presença de UMT.

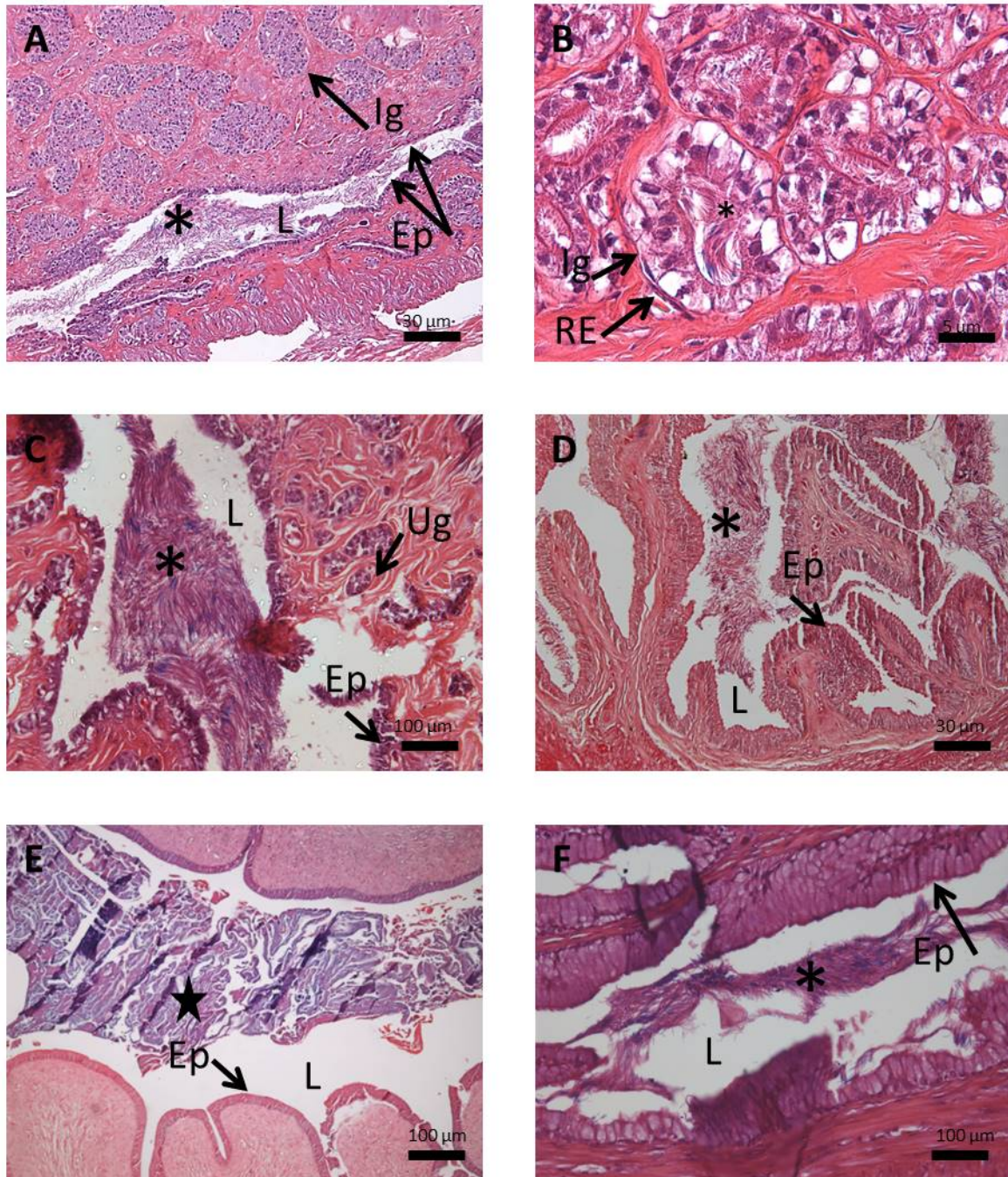


Figura 8: Estocagem de esperma e plugs copulatórios no trato reprodutivo de fêmeas do grupo *B. neuwiedi*. **A.** Grande quantidade de esperma no lúmen do infundíbulo (*B. marmoratus*, CHUNB 59529). **B.** A seta aponta para um receptáculo de esperma no infundíbulo preenchido por espermatozoides (*B. marmoratus*, CHUNB 59529). **C.** Esperma no útero (*B. mottogrossensis*, UFMS 1346). **D.** Esperma na JUV (*B. neuwiedi*, MN 18930). **E.** Plug gelatinoso na vagina (*B. neuwiedi*, MN 19399). **F.** Esperma na vagina (*B. marmoratus*, CHUNB 59524). Os asteriscos indicam a presença de esperma e a estrela do plug copulatório.

Discussão

Há diferentes terminologias para as porções do oviduto de serpentes (veja Rojas et al., 2015 e Siegel et al., 2011 para uma revisão sobre as propostas), assim como há debate sobre as funções atribuídas a cada uma dessas partes (Rojas et al., 2015). Nossa proposta é que para as serpentes do grupo *B. neuwiedi* aqui estudadas, e também para as demais espécies do gênero *Bothrops*, seja aplicada a terminologia do oviduto proposta recentemente por Rojas et al. (2015), utilizando a serpente Dipsadidae, *Philodryas patagoniensis*, como modelo de estudo para a morfofisiologia do oviduto. Em *B. marmoratus* observamos um padrão diferente de vagina, que pode ser considerada uma variação anatômica em relação ao formato descrito anteriormente para o gênero *Bothrops* (Almeida-Santos e Orsi, 2000, Barros et al. 2014a,b). A amostragem de mais indivíduos e a realização de cortes seriados dessa região poderão fornecer maiores detalhes sobre a estrutura e morfologia desta porção do oviduto, podendo inclusive ser uma variação morfológica em relação aos tipos de vagina existentes - descritos sob a terminologia “pouch”, livremente traduzida como “bolsa” por Siegel et al. (2011).

Assim como para outras serpentes, o infundíbulo pode ser dividido em regiões anterior e posterior, com a presença de glândulas que funcionam como receptáculos de esperma no infundíbulo posterior, que fica entre o infundíbulo anterior e o útero (Fox, 1956, Halpert et al., 1982, Perkins e Palmer, 1996, Sever e Ryan, 1999, Siegel et al., 2011, Rojas et al., 2015). Neste estudo, esperma no infundíbulo foi identificado apenas em uma fêmea de *B. marmoratus* coletada no cerrado da região central do Brasil no mês de março, entre o final do verão e o início do outono, período no qual é comum a cópula em serpentes desse gênero (Almeida-Santos e Salomão, 2002). O esperma estava presente

tanto no lúmen do infundíbulo quanto dentro das glândulas que funcionam como receptáculos de esperma. Esta fêmea de *B. marmoratus* também apresentava esperma nas criptas da JUV, o que comprova que estas serpentes são capazes de estocar esperma em dois sítios simultaneamente como documentado também para *B. atrox* (Silva, 2015) e *B. alternatus* (Amaral, 2015).

Interessante notar que o oviduto da fêmea de *B. marmoratus* onde encontramos esperma na JUV apresentava aspecto liso nesta porção, sem a presença da UMT, que não foi observada nesta espécie. A presença de esperma nas duas porções simultaneamente - inclusive com grande quantidade de esperma no lúmen do infundíbulo - nos permite propor que a cópula tenha ocorrido nesta estação (final do verão/ início do outono) e que o esperma tenha ascendido imediatamente pelo útero até o infundíbulo e os receptáculos de esperma. Além disso, a cópula neste período é corroborada pela descoberta de esperma na vagina de outra fêmea de *B. marmoratus* coletada também no mês de março. Por um lado, estes dados corroboram as revisões anteriores sobre a reprodução no gênero *Bothrops* (Almeida-Santos e Salomão, 2002) em relação ao período de cópula outonal, e por outro lado apresentam uma variação existente em relação ao modelo de estocagem de esperma proposto para os viperídeos da região neotropical por Almeida-Santos e Salomão (1997, 2002). Como em geral nos viperídeos neotropicais, a cópula no outono é dissociada da ovulação na primavera (Almeida-Santos e Salomão, 2002), a estocagem de esperma garante a sincronização dos eventos reprodutivos (Schuett, 1992). Almeida-Santos e Salomão (1997) propuseram que o UMT seja o mecanismo responsável por esta sincronização neste grupo de serpentes. Após a cópula no outono, ocorre a formação da contorção (UMT) na JUV das fêmeas, bloqueando a passagem do esperma para outras porções mais craniais do oviduto. O esperma

permanece estocado na UMT durante todo outono e inverno, ascendendo pelo útero até o infundíbulo somente na primavera quando a contorção na JUV (UMT) se desfaz e ocorre a ovulação (Almeida-Santos e Salomão, 1997, 2002). A prenhez ocorre durante a primavera/ verão e os filhotes de *Bothrops* nascem principalmente no verão, mas também no início do outono para algumas espécies (Almeida-Santos e Salomão, 1997, 2002). Existem variações no gênero *Bothrops* em relação a este padrão, como documentado aqui para *B. marmoratus* e também para *B. erythromelas*, espécie na qual a ocorrência de UMT foi considerada como um polimorfismo em função de sua rara ocorrência na população, ou seja, embora o UMT já tenha sido observado em uma fêmea desta espécie, a análise de uma quantidade significativa de indivíduos não revelou o uso desta estratégia para a maior parte das fêmeas amostradas (Barros et al., 2014).

Embora possa haver variações, os dados obtidos para *Crotalus durissus* e para várias espécies de *Bothrops* corroboram a teoria de estocagem de esperma durante o outono e inverno no UMT (*B. jararaca*, Almeida-Santos, 2005, Kasperoviczus, 2013, *B. insularis*, Kasperoviczus, 2009, *B. leucurus*, Barros et al., 2014). Os dados apresentados para *B. diporus* neste estudo também corroboram esta hipótese. Já para *B. neuwiedi*, a estocagem na JUV foi documentada neste estudo tanto na presença quanto na ausência de UMT. Siegel e Sever (2006) apresentaram uma série de questionamentos sobre o processo de formação do UMT e sua função na estocagem de esperma. Neste estudo, esperma foi encontrado no infundíbulo em apenas uma das 72 fêmeas amostradas. Por outro lado, dentre as seis fêmeas com esperma na JUV, cinco apresentavam UMT. Almeida-Santos e Salomão (1997) apontam para uma diferença entre o aspecto microscópico da JUV em fêmeas com e sem a presença da contorção macroscópica (UMT), relatando que em fêmeas pós-parto (ou seja, sem UMT) o lúmen era maior e mais

facilmente visível. Embora ainda não tenham sido coletadas medidas que comprovem este fato, pode ser que a UMT promova o aumento das dobras do epitélio e a diminuição do lúmen, tornando as criptas da JUV mais profundas e consequentemente melhores sítios para estocagem de esperma. Isto explica a maior taxa de encontro de espermatozóides na presença de UMT, e também corrobora sua função na estocagem de esperma. De qualquer forma, independente de uma possível função alternativa para a UMT, a JUV é um sítio de estocagem de esperma em serpentes, com relatos de estocagem de esperma nas suas criptas (Almeida-Santos e Salomão, 1997, 2002, Barros et al 2012, 2014, Rojas et al., 2015) ou até mesmo em glândulas (Sever e Ryan, 1999). Note que Sever e Ryan (1999) denominam a área considerada aqui como JUV como vagina e por isso descrevem as glândulas como glândulas vaginais. O oviduto, assim como outros órgãos, pode apresentar um continuum entre as suas diferentes partes, como uma área de transição. As criptas no início da vagina de *B. pubescens* podem ser consideradas como glândulas em função de seu formato e poderiam ser um eventual sítio de estocagem de esperma em função de sua semelhança com as glândulas descritas por Sever e Ryan (1999).

Variações podem ocorrer tanto na anatomia das espécies e dos indivíduos, como também nos ciclos reprodutivos para *Bothrops*. Conforme documentado aqui e também previamente por outros autores, há variação em relação à época de ocorrência de eventos reprodutivos neste gênero (Capítulo 7 desta tese). Almeida-Santos e Salomão (2002) reuniram os dados disponíveis na literatura sobre a reprodução de *Bothrops* até aquele momento e propuseram a hipótese de que o padrão reprodutivo observado neste gênero representaria a retenção de um padrão ancestral ao longo desta linhagem filogenética, de forma que as diferenças climáticas entre os ambientes ocupados pelas

espécies atualmente não teriam um papel importante na determinação dos eventos reprodutivos nas espécies deste gênero. Corte, acasalamento e combate ocorreriam no outono (de abril a junho); vitelogênese e estocagem de esperma nas fêmeas por meio da contração muscular uterina (“UMT – uterine muscular twisting”, cf. Almeida-Santos & Salomão, 1997; 2002) durante o outono e inverno (Julho a Setembro); fertilização na primavera (outubro a dezembro) e, finalmente, o nascimento dos filhotes ocorreria na estação chuvosa, durante o verão (janeiro a março) (Almeida-Santos & Salomão, 2002). Porém, o ciclo reprodutivo de *B. leucurus* (Barros, 2011) assim como os ciclos de outras espécies do grupo *B. atrox*, como *B. asper* (Solórzano & Cerdas, 1989), *B. moojeni* (Nogueira et al., 2003) e *B. atrox* (Fitch, 1970; Duellman, 1978; Cunha & Nascimento, 1981; Oliveira, 2003), apresentam variações temporais em alguns eventos reprodutivos (e.g. vitelogênese secundária, ovulação e/ou época de nascimento dos filhotes) em relação ao que foi proposto por Almeida-Santos & Salomão (2002) como padrão para o gênero *Bothrops*. Neste documentamos a existência de fêmeas de *B. mattogrossensis* e *B. pauloensis* com embriões no oviduto entre os meses de julho e agosto, durante o inverno. Estas serpentes foram coletadas respectivamente nas regiões central e norte do Brasil, onde em geral não há um inverno rigoroso e altas temperaturas são mantidas ao longo do ano todo, o que torna viável a prenhez de um animal ectotérmico nessa época do ano. Se a presença do plug gelatinoso for considerada como uma evidência de cópula, além dos relatos de ocorrência do plug no período conhecido para a cópula (fim do verão e outono), também há relatos para a primavera (entre outubro e dezembro). Novas observações contribuirão para a composição dos ciclos das serpentes do grupo *B. neuwiedi*. Avanços nos estudos da evolução e taxonomia deste grupo também favorecerão a análise adequada dos ciclos reprodutivos de cada espécie, e

consequentemente na descrição da variação intra e interespecífica das táticas reprodutivas empregadas por estas serpentes. Machado et al. (2014) demonstrou que, da forma como as espécies são reconhecidas hoje (com base em caracteres morfológicos), com exceção de *B. pubescens* que é uma espécie monofilética, todas as espécies desse grupo são polifiléticas e que pelo menos três novas espécies podem ser descritas para este grupo (Machado et al., 2014). O estudo do ciclo reprodutivo dos machos das espécies abordadas aqui também é importante para a compreensão da reprodução neste grupo.

Referências

- Aldridge, R. D., Jellen, B. C., Siegel, D. S., Wisniewski, S. S. 2011. The sexual segment of the kidney. In Aldridge, R. D., Sever, D. M. (Eds). *Reproductive biology and phylogeny of snakes*, pp. 477-509. Science Publishers, Enfield.
- Almeida-Santos, S. M. Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). 2005. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Almeida-Santos, S. M., Braz, H. B., Santos, L. C., Sueiro, L. R., Barros, V. A., Rojas, C. A. e Kasperoviczus, K. N. 2014. Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados. - *Herpetologia Brasileira* 3: 14-24.
- Almeida-Santos, S. M. e Salomão, M. G. 1997. Long-term sperm storage in the Neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalidae). - *Japanese Journal of Herpetology* 17: 46-52.

Almeida-Santos, S. M. e Orsi, A. M. 2002. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morfologia e função do oviduto. - *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 26: 109-112.

Almeida-Santos, S. M. e Salomão, M. G. 2002. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In Schuett, G., Höggren, M., Douglas, M.E. and Greene, H. W. (Eds.): *Biology of the vipers*, pp. 445-462. Carmel, Eagle Mountain.

Amaral, F. M. 2015. Estratégias reprodutivas da serpente *Bothrops alternatus*: influência de fatores ambientais. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Barros, V. A., Rojas, C. A. e Almeida-Santos, S. M. 2014a. Is rainfall seasonality important for reproductive strategies in viviparous Neotropical pit vipers? A case study with *Bothrops leucurus* from the Brazilian Atlantic Forest. - *Herpetological Journal* 24: 67-75.

Barros, V. A., Rojas, C. A. e Almeida-Santos, S. M. 2014b. Reproductive Biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. - *Advances in Zoology* 2014: 1-11.

Barros, V. A., Sueiro, L. R. e Almeida-Santos, S. M. 2012. Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of phylogenetic conservations of reproductive patterns. - *Herpetological Journal* 22: 97-104.

Barros, V. A. 2011. Biologia reprodutiva de três espécies de serpentes da Família Viperidae da região neotropical. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

Birkhead, T. R. e A. P. Moller. 1993. Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. - *Biological Journal of the Linnean Society* 50, 295-311.

- Crews, D. e Garstka, W. R. 1982. The ecological physiology of a garter snake. - *Scientific American* 1982: 159 – 168.
- Cunha, O.R. e Nascimento, F.P. 1981. Ofídios da Amazônia. XII – Observações sobre a viviparidade em ofídios do Pará e Maranhão (Ophidia, Aniliidae, Boidae, Colubridae e Viperidae). - *Boletim do Museu Emílio Goeldi, série Zoologia* 109: 1-20.
- Duellman, W.E. 1978. The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. *Miscellaneous publications – University of Kansas, Museum of Natural History. University of Kansas, Kansas*.65.
- Fitch, H. 1970. Reproductive cycles of lizard and snakes. *Miscellaneous publications – University of Kansas, Museum of Natural History. University of Kansas, Kansas*.
- Fox, W. 1956. Seminal receptacles of snakes. – *Anatomical Record* 124: 519-539.
- Friesen, C. R., Shine, R., Krohmer, R. W. e Mason, R. T. 2013. Not just a chastity belt: the functional significance of mating plugs in garter snakes, revisited. - *Biological Journal of the Linnean Society* 109: 893-907.
- Giraud, A. R., Arzamendia, V., Lopez, S. M., Quaini, R. O., Prieto, Y., Leiva, L. A., Regner, S. A., Urban, J. M. 2008. Serpientes venenosas de Santa Fe, Argentina: conocimientos sobre su historia natural aplicados para la prevención de ofidismo. - *Revista FABICIB* 12: 69-89.
- Halpert, A. P., Garstka, W. R. e Crews, D. 1982. Sperm transport and storage and its relation to the anual sexual cycle of the female red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*. – *Journal of Morphology* 174: 149-159.
- Hartmann, M. T., Marques, O. A. V., Almeida-Santos, S. M. 2004. Reproductive biology of the southern Brazilian pitviper *Bothrops neuwiedi pubescens* (Serpentes, Viperidae). - *Amphibia-Reptilia* 25: 77-85.

- Höggren, M. e Tegelström, H. 1995. DNA fingerprinting shows within-season multiple paternity in the adder (*Vipera berus*). - *Copeia* 1995: 271-277.
- Kasperoviczus, K. N. 2009. Biologia reprodutiva da jararaca ilhoa, *Bothrops insularis* (Serpentes, Viperidae) da Ilha da Queimada Grande, São Paulo. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Kasperoviczus, K. N. 2013. Evolução das estratégias reprodutivas de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Machado, T., Silva, V. X. e Silva, M. J. J. 2014. Phylogenetic relationships within *Bothrops neuwiedi* group (Serpentes, Squamata): geographically highly-structured lineages, evidence of introgressive hybridization and Neogene/ Quaternary diversification. - *Molecular phylogenetics and evolution* 71: 1-14.
- Mathies, T. 2011. Reproductive cycles of tropical snakes. In – R. D. Aldridge and D. M. Sever (Eds): *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*, CRC Press, Enfield.
- Monteiro, C., Montgomery, C. E., Spina, F., Sawaya, R. J. e, Martins, M. 2006. Feeding, reproduction, and morphology of *Bothrops mattogrossensis* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) in the Brazilian Pantanal. *Journal of Herpetology* 40:408-413.
- Moreira, P. L. e Birkhead, T. R. 2003. Copulatory plugs in the Iberian rock lizard do not prevent insemination by rival males. - *Functional Ecology* 17: 796-802.
- Moreira, P. L. e Birkhead, T. R. 2004. Copulatory plug displacement and prolonged copulation in the Iberian rock lizard (*Lacerta monticola*). - *Behavioral Ecology and Sociobiology* 56: 290-297.

- Moreira, P. L., López, P. e Martín, J. 2006. Femoral secretions and copulatory plugs convey chemical information about male identity and dominance status in Iberian rock lizards (*Lacerta monticola*). - *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60: 166-174.
- Moreira, P. L., Nunes, V. L., Martín, J. e Paulo, O. S. 2007. Copulatory plugs do not assure high first male fertilisation success: sperm displacement in a lizard. - *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62, 281-288.
- Nogueira, C., Sawaya, R. J. e Martins, M. 2003. Ecology of the pitviper, *Bothrops moojeni* in the Brazilian Cerrado. - *Journal of Herpetology* 37: 653-659.
- Oliveira, M. E. E. S. 2003. História natural de jararacas brasileiras do grupo *Bothrops atrox* (SERPENTES, VIPERIDAE). Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Brasil.
- Olsson, M. e Madsen, T. 1998. Sexual selection and sperm competition in reptiles. In Birkhead, T. R. e Moller, A. P. Sperm competition and sexual selection, pp. 503-577. Academic Press, San Diego.
- Perkins, M. J. e Palmer, B. D. 1996. Histology and functional morphology of the oviduct of an oviparous snake, *Diadophis punctatus*. - *Journal of Morphology* 227: 67-79.
- Reis, P. M. A. G., Coelho, R. D. F., Menezes, L. M. N. e Ribeiro, L. B. 2015. Contribution to the reproductive biology of *Bothrops erythromelas* (Squamata: Viperidae) in the semiarid region of Brazil. - *Herpetological Review* 46: 327-331.
- Resende, F. C. e Nascimento, L. B. 2014. The Female Reproductive Cycle of the Neotropical Snake *Atractus pantostictus* (Fernandes and Puerto, 1993) from South-eastern Brazil. - *Anatomia Histologia Embryologia* 43: 1-11.

- Rojas, C. A., Barros, V. A. e Almeida-Santos, S. M. 2013. The reproductive cycle of the male sleep snake *Sibynomorphus mikanii* (Schlegel, 1837) from southeastern Brazil. – *Journal of Morphology* 274: 215–228.
- Rojas, C. A., Barros, V. A. e Almeida-Santos, S. M. 2015. Sperm storage and morphofunctional bases of the female reproductive tract of the snake *Philodryas patagoniensis* from southeastern Brazil. - *Zoomorphology* 134: 577-586.
- Schuett, G.W. 1992. Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers? In Campbell, J.A. e Brodie, E.D. (Eds.). *Biology of the Pitvipers*, pp. 169-184. Tyller, Selva.
- Schwartz, J. M., Mc Cracken, G. F. e Burghardt, G. M. 1989. Multiple paternity in wild populations of the garter snake, *Thamnophis sirtalis*. - *Behavioral Ecology and Sociobiology* 25: 269-273.
- Sever, D. M. e Ryan, T. J. 1999. Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*): Part I. Evidence for oviducal sperm storage. - *Journal of Morphology* 241: 1–18.
- Shine, R., Olsson, M. M. e Mason, R. T. 2000. Chastity belts in gartersnakes: the functional significance of mating plugs. - *Biological Journal of the Linnean Society* 70: 377-390.
- Siegel, D. S., Miralles, A., Trauth, S. E. e Aldridge, R. D. 2011. The phylogenetic distribution and morphological variation of the “pouch” in female snakes. - *Acta Zoologica* 93, 400-408.
- Siegel, D. S. e Sever, D. M. 2006. Uterine-muscular twisting and sperm storage in viperids. - *Herpetological Conservation & Biology* 1: 87-92.

Siegel, D. S., Miralles, A., Chabarria, R. E. e Aldridge, R. D. 2011. Female reproductive anatomy: cloaca, oviduct, and sperm storage. In – R. D. Aldridge and D. M. Sever (Eds): *Reproductive Biology and Philogeny of Snakes*, pp. 347-409. CRC Press, Enfield.

Silva, V. X. e Rodrigues, M. T. 2008. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. - *Phyllomedusa* 7: 45-90.

Silva, K. M. P. 2015. Biologia reprodutiva da jararaca da Amazônia, *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae). Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

Travaglia-Cardoso, S. R. 2011. História natural das serpentes da região de Munhoz, sul de Minas Gerais, Serra da Mantiqueira. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

Werneck, F. P. 2011. The diversification of eastern South American open vegetation biomes: historical biogeography and perspectives. - *Quaternary Science Reviews* 30: 1630-1648.

Wüster, W. et al. 2002. Origins and Evolution of the South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In Schuett, G. W. et al. (Eds). *Biology of the vipers* pp.111- 128. Eagle Mountain Publishing, Utah.

Capítulo 2

Ciclos espermatogênico, do segmento sexual renal e
estocagem de esperma nos machos de *Bothrops pubescens*
incluindo uma análise da relação dos eventos reprodutivos
com o clima atual do sul do Brasil

Resumo

Este estudo descreve a variação sazonal dos componentes do ciclo reprodutivo de *Bothrops pubescens*, uma espécie de serpente peçonhenta da região sul do Brasil. Os indivíduos foram amostrados no estado do Rio Grande do Sul, uma região fria, onde o clima varia de subtropical a subtemperado e temperado. Como animais ectotérmicos, baixas temperaturas são fatores limitantes para a atividade das serpentes e por isso nossa hipótese inicial era de que o clima frio influenciasse a sazonalidade dos eventos reprodutivos nos machos de *B. pubescens* com consequente pico reprodutivo nas estações mais quentes (verão e primavera). Para compor o ciclo reprodutivo foram caracterizados, por meio de análises histológicas, o ciclo testicular, do segmento sexual renal e do ducto deferente, incluindo a análise da variação sazonal da altura do epitélio e diâmetro dos túbulos tanto dos testículos, quanto do segmento sexual renal. Para fins de comparação, como indicadores macroscópicos do ciclo reprodutivo foram considerados o tamanho do testículo e o diâmetro do ducto deferente na região caudal. Para testar a relação entre o clima atual e os eventos reprodutivos foram realizados testes de regressão linear entre três variáveis climáticas (temperatura máxima, mínima e pluviosidade) e os indicadores microscópicos do testículo e rim. Os testes estatísticos não demonstraram relação entre estas variáveis. Houve variação sazonal acentuada dos parâmetros reprodutivos, com forte aumento no verão e pico no outono, tanto para a atividade espermatogênica, quanto para o segmento sexual renal. O pico reprodutivo não está restrito aos períodos mais quentes e ocorre na mesma época que o pico reprodutivo de outras espécies filogeneticamente próximas, tanto do grupo *B. neuwiedi*, quanto do

gênero *Bothrops*, o que aponta para uma grande influência da inércia filogenética na determinação da época de ocorrência dos eventos reprodutivos neste gênero.

Introdução

As serpentes do gênero *Bothrops* são amplamente distribuídas por diferentes ecossistemas na região neotropical (Campbell & Lamar, 2004) e são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos que ocorrem no Brasil (Araújo et al., 2003). Embora o Brasil seja um país tropical, classificação associada com as altas temperaturas que ocorrem em grande parte do país, os estados do sul como o Rio Grande do Sul têm climas mais frios com estações do ano bem definidas e inverno frio (Mendonça & Danni-Oliveira, 2007; Maluf, 2000). Como as serpentes são animais ectotérmicos, as condições climáticas tem uma grande influência sobre seu metabolismo. Baixas temperaturas são fatores limitantes para a atividade desses animais (Gibbons & Semlitsch, 1987).

Bothrops pubescens é uma serpente peçonhenta de tamanho médio comum na região sul do Brasil. Apresenta dieta generalista (e.g. roedores e anuros são as principais presas), hábitos terrestres e vive em áreas florestais e suas adjacências, incluindo áreas degradadas próximas a fragmentos florestais (Hartmann et al., 2005). A distribuição de *B. pubescens* se estende do sul do Brasil até o Uruguai (Campbell & Lamar, 2004). Por ser uma serpente abundante e responsável por muitos acidentes ofídicos, trata-se de uma espécie importante para a saúde pública no Estado do Rio Grande do Sul (Bochner & Struchiner, 2003, Araújo et al., 2003). No futuro, como consequência das mudanças climáticas globais, a distribuição das serpentes venenosas pode sofrer mudanças em função das mudanças nos habitats (Nori et al., 2014). A área potencial de distribuição de algumas espécies especialistas em habitat pode diminuir se o habitat for reduzido com o

aumento da temperatura, mas por outro lado, no caso de algumas espécies generalistas, como *B. pubescens*, a distribuição pode aumentar, caso a espécie se adapte às novas condições ambientais. Mudanças no padrão de distribuição de *B. pubescens* podem ter impacto no sistema de atendimento às vítimas destes acidentes ofídicos. Por isso, é importante entender bem a biologia das espécies de serpentes venenosas para subsidiar, futuramente, possíveis medidas de manejo tanto para espécies que são importantes para a saúde pública, quanto para aquelas que estão ameaçadas de extinção.

Dados sobre a história natural de *B. pubescens* estão disponíveis em Hartmann et al. (2004, 2005). Hartmann et al (2004) descreveram vários aspectos da biologia reprodutiva de *B. pubescens*. Como em outras espécies de serpentes, existe dimorfismo sexual em relação ao tamanho corporal (as fêmeas são o maior sexo) e os machos atingem a maturidade sexual com um tamanho corporal menor do que as fêmeas (Hartmann et al., 2004). Em relação ao ciclo reprodutivo das fêmeas, a vitelogênese foi observada ao longo do ano todo, embora embriões sejam observados nos ovidutos apenas entre Outubro e Março. Embriões em estágio inicial foram observados entre Outubro e Dezembro, enquanto embriões em estágios mais avançados de desenvolvimento foram encontrados entre Janeiro e Março, o que indica que, em vida livre, a ovulação ocorra na primavera e o nascimento dos filhotes no verão. Em cativeiro, também há relatos de nascimentos para este período, o que confirma que o ciclo reprodutivo das fêmeas tem um forte componente sazonal (Hartmann et al., 2004). Por outro lado, ainda não existem dados disponíveis sobre o ciclo reprodutivo dos machos. O objetivo deste estudo é descrever o ciclo reprodutivo dos machos de *B. pubescens* utilizando análises da variação sazonal dos testículos, rins e ductos deferentes. Além disso, procuramos analisar a possível influência de fatores climáticos (padrões de

temperatura e pluviosidade) sobre a sazonalidade destes eventos reprodutivos. Considerando que alguns eventos do ciclo reprodutivo do macho (e.g. espermatogênese) são dependentes da temperatura em serpentes (Saint-Girons, 1982), e que o clima do Rio Grande do Sul tem um forte componente de sazonalidade com períodos frios no inverno, esperamos que os padrões climáticos tenham influência sobre a sazonalidade dos eventos reprodutivos dos machos de *B. pubescens* com consequente concentração dos eventos reprodutivos nas estações mais quentes do ano (verão e primavera).

Material e Métodos

Amostragem de indivíduos

Este estudo é baseado na análise macroscópica e microscópica do trato urogenital de machos sexualmente maduros de *B. pubescens* do Rio Grande do Sul (RS), na região sul do Brasil. Foram amostrados 44 machos no total. Os dados foram obtidos a partir da dissecação de espécimes preservados na coleção herpetológica do “Museu de Ciência e Tecnologia” (MCT) da Pontifícia Universidade Católica (PUC) no Rio Grande do Sul. Estes indivíduos foram coletados neste Estado nos seguintes municípios: Dom Feliciano, Sobradinho Santana da Boa Vista, São Jerônimo, Novo Cabrais Encruzilhada do Sul, Guaíba, Cachoeira do Sul, Viamao, Cerro Branco, Porto Alegre, Eldorado do Sul, Barão do Triunfo, Sertão Santana e Paraíso do Sul, localizados nos biomas Pampas e Mata Atlântica. Serpentes que foram mantidas em cativeiro não foram incluídas na amostragem.

Caracterização do clima local

No Estado do Rio Grande do Sul o clima é característico de áreas mais frias e pode ser classificado em três tipos: subtropical, subtemperado e temperado (Maluf, 2000). O padrão climático da região amostrada foi caracterizado utilizando o programa DIVA-GIS e a base de dados WordClim (clima atual, dados coletados no período de 1950 a 2000, versão 1.3, resolução 10 minutos). Para cada município em que houve amostragem de indivíduos para coleta de tecidos para análises histológicas, foram considerados os dados referentes às médias das temperaturas máxima, mínima e pluviosidade (Apêndice 1). Para facilitar a visualização do padrão climático da região, foram elaborados climatogramas com a base de dados do Wordclim (Apêndice 2).

Coleta e análise de dados reprodutivos

Após a dissecação e análise macroscópica do trato urogenital de cada indivíduo, foram registradas duas variáveis macroscópicas: o comprimento do testículo direito e a largura da porção distal do ducto deferente direito próximo à região da cloaca. O tamanho (comprimento) do testículo foi utilizado como parâmetro indicador da atividade espermatogênica (Volsøe, 1944) e a variação do diâmetro do ducto deferente foi utilizada como indicador de estocagem de espermatozoides no ducto deferente (Almeida-Santos et al., 2006). Para as análises microscópicas, foram coletados fragmentos do testículo, da porção anterior do rim e da porção distal do ducto deferente. Estes órgãos foram preservados em álcool 70% e processados para histologia pelo método de parafina. Foram feitos cortes de 5 µm de espessura para coloração com hematoxilina e eosina (H/E). Foram coletadas amostras dos órgãos reprodutivos para análise histológica de 40 indivíduos. A análise das lâminas histológicas demonstrou que alguns tecidos já estavam

em processo de autólise e por esta razão, cinco amostras foram descartadas da análise e apenas as amostras com boa qualidade foram consideradas para tomada das medidas microscópicas descritas a seguir.

Para analisar a variação sazonal microscópica dos testículos e rins, foram consideradas as mudanças estruturais e morfológicas nestes órgãos. As mudanças estruturais nos testículos e rins foram avaliadas pelas seguintes medidas: diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio seminífero, para o testículo; diâmetro do SSR e altura do epitélio do SSR, para os rins. Para cada indivíduo foram obtidas imagens utilizando o Programa Olympus Pro Express. A partir destas imagens, foram obtidas dez medidas de cada uma destas variáveis microscópicas utilizando o programa Image J. Foram realizadas medidas somente de túbulos com formato circular tanto para o testículo, quanto para o SSR.

Para definir os estágios da espermatogênese em *B. pubescens* seguimos uma adaptação de Goldberg & Parker (1975) e Rojas et al. (2013), considerando a regressão completa como estágio I, o início da recrudescência como estágio II, o final da recrudescência como estágio III, o início da espermiogênese como estágio IV, a espermiogênese como estágio V, e o início da regressão como estágio VI. Para o SSR, foi realizada uma comparação visual em relação às mudanças sazonais na densidade dos grânulos seguindo uma escala de 0 a 4, conforme descrito em Krohmer et al. (2004) e Rojas et al. (2013): 0 = hipertrofia ausente, 1 = hipertrofia com poucos grânulos, 2 = hipertrofia com grânulos evidentes espalhados pelo citoplasma de todas as células epiteliais, 3 = grânulos secretores visíveis na região apical do citoplasma, 4 = densidade máxima de grânulos secretores no citoplasma.

Análises estatísticas

Sazonalidade das variáveis macroscópicas e microscópicas

Para avaliar a existência de relação alométrica entre o comprimento do testículo e o CRC dos machos de *B. pubescens* foi realizada uma regressão linear. Como há relação entre essas variáveis, foi realizada uma análise de covariância (teste ANCOVA), utilizando o CRC como co-variável para verificar se há diferença no comprimento do testículo entre as estações do ano (primavera, verão, outono, inverno).

A variação sazonal da largura do ducto deferente foi verificada pelo teste ANOVA, uma vez que o aumento na largura se dá pela estocagem de maior ou menor quantidade de espermatozoides no ducto e não por uma relação alométrica.

As variações sazonais em relação ao diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero, diâmetro do SSR e altura do epitélio no SSR, foram testadas por ANOVA. As diferenças entre as estações foram analisadas pelo teste post-hoc de Tukey.

Teste da relação entre as condições climáticas atuais e o estágio reprodutivo

Testes de regressão linear foram utilizados para verificar se há relação entre três variáveis climáticas (temperatura máxima, temperatura mínima e pluviosidade) e quatro indicadores microscópicos do estágio reprodutivo nos machos, considerando tanto variáveis relacionadas ao testículo (diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio seminífero), quanto ao rim (diâmetro do SSR e altura do epitélio do SSR). Os dados climáticos foram considerados como variável independente e os dados reprodutivos como variável dependente. Com estes testes estatísticos pretendemos investigar se o aumento na variável reprodutiva ocorre de acordo com o aumento da variável climática.

Foram realizados testes considerando tanto a média quanto a maior medida de cada variável reprodutiva obtida em cada indivíduo analisado. Em relação às variáveis climáticas, foram utilizados os dados referentes ao mês de coleta de cada indivíduo. Por exemplo, para avaliar se existe relação entre o diâmetro do túbulo seminífero de um macho coletado em agosto, foi utilizada a média das temperaturas máximas registradas entre 1950 e 2000 para o mês de agosto.

Resultados

Ciclo testicular

O comprimento dos testículos é positivamente correlacionado com o CRC ($F = 12,4182$; $p = 0,0014$), porém não apresenta variação sazonal (ANCOVA, $F = 0,86132$; $p = 0,46926$) (Fig. 1).

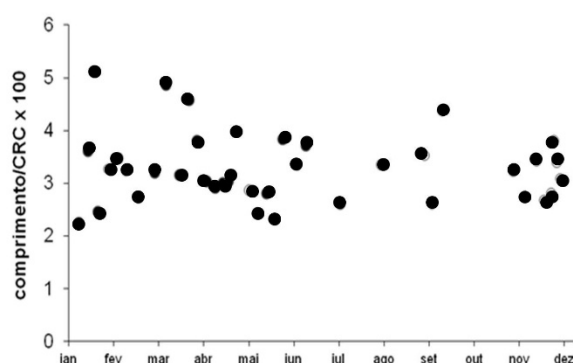


Figura 1: Variação sazonal do comprimento relativo do testículo em *Bothrops pubescens*.

Análises histológicas demonstram que o pico da espermatogênese ocorre entre o verão e o outono (Fig. 2). Durante o verão foram observados indivíduos com o testículo ativo em diferentes fases da espermatogênese (Tabela 1), inclusive no final da

espermiogênese com a presença de espermatozoides maduros no lúmen dos túbulos seminíferos (Fig. 2A).

No outono, os testículos atingem um pico de produção espermática (Fig. 2B, Tabela 1), conforme demonstrado tanto pelo aumento significativo do diâmetro dos túbulos seminíferos, quanto pela altura do epitélio seminífero em relação a outras estações do ano (Figs. 3A, B). Em relação à variação sazonal do diâmetro dos túbulos seminíferos ($F = 8,5587$, $p < 0,0001$) e da altura do epitélio seminífero ($F = 43,6799$, $p < 0,0001$), estes parâmetros apresentaram valores maiores no verão e outono em comparação com a primavera e o inverno ($p < 0,05$). Não houve diferenças significativas entre a primavera e inverno, e entre o verão e outono ($p > 0,05$) (Fig. 3A).

Durante o inverno, ocorre uma diminuição da atividade testicular observada pela diminuição do diâmetro dos túbulos e regressão do epitélio seminífero (Tabela 1, Fig. 2 C,D, Fig. 3 A,B). Importante ressaltar que houve variabilidade em relação ao estágio espermatogênico de cada indivíduo dentro das estações (Tabela 1). Durante a primavera, quando ocorre o início da recrudescência (Tabela 1), há variabilidade na população em relação ao nível de atividade do testículo, que pode apresentar níveis mais baixos (Fig. 2D) ou ainda se encontrar em estágio inicial de regressão com epitélio mais alto.

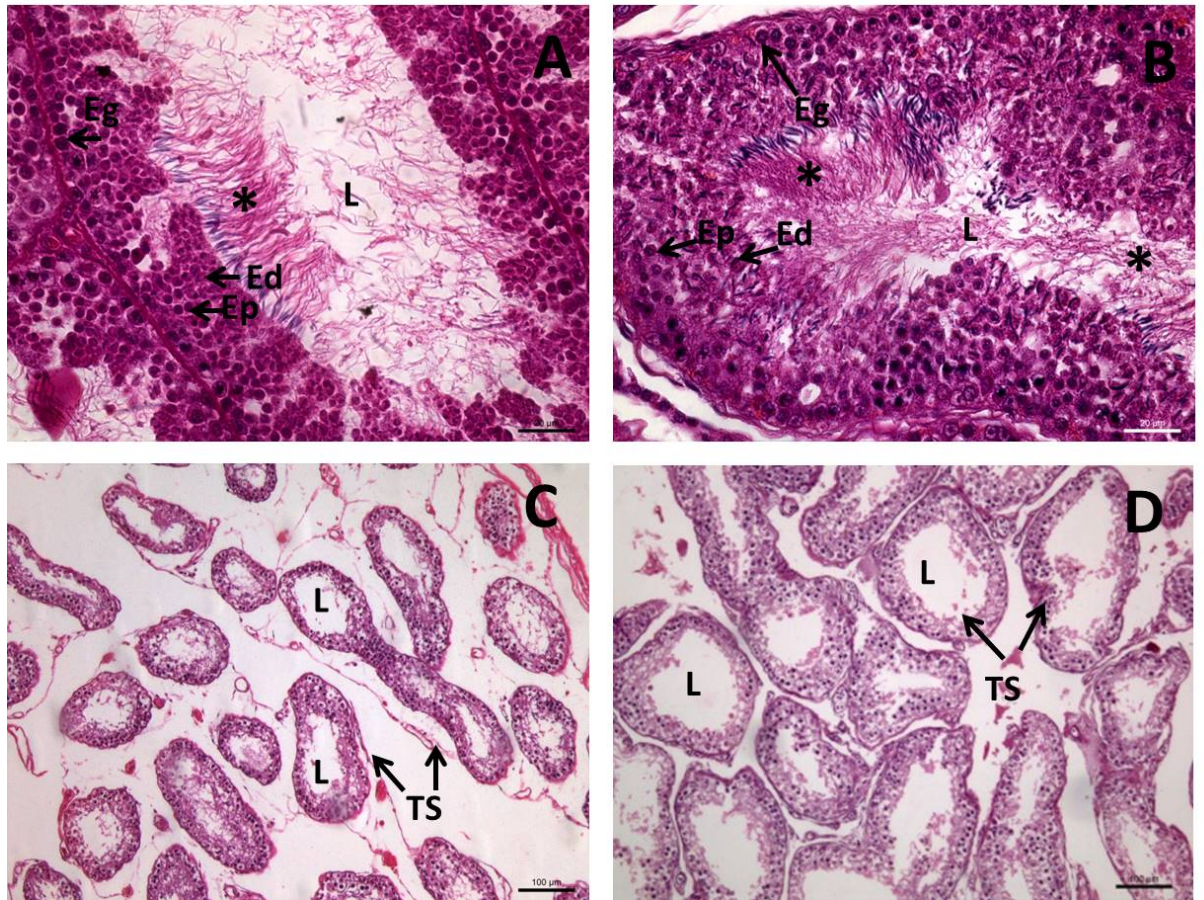


Figura 2: Fotomicrografias do testículo de *Bothrops pubescens* mostrando a variação sazonal no ciclo testicular. **A.** Espermiogênese no verão. **B.** Pico da espermatogênese no outono. **C.** Epitélio seminífero mais baixo durante o inverno. **D.** Início da recrudescência na primavera. Eg : espermatogônia, Ep: espermatócito, Ed: espermatíde, L: lúmen, TS: túbulos seminíferos, * : espermatozóides.

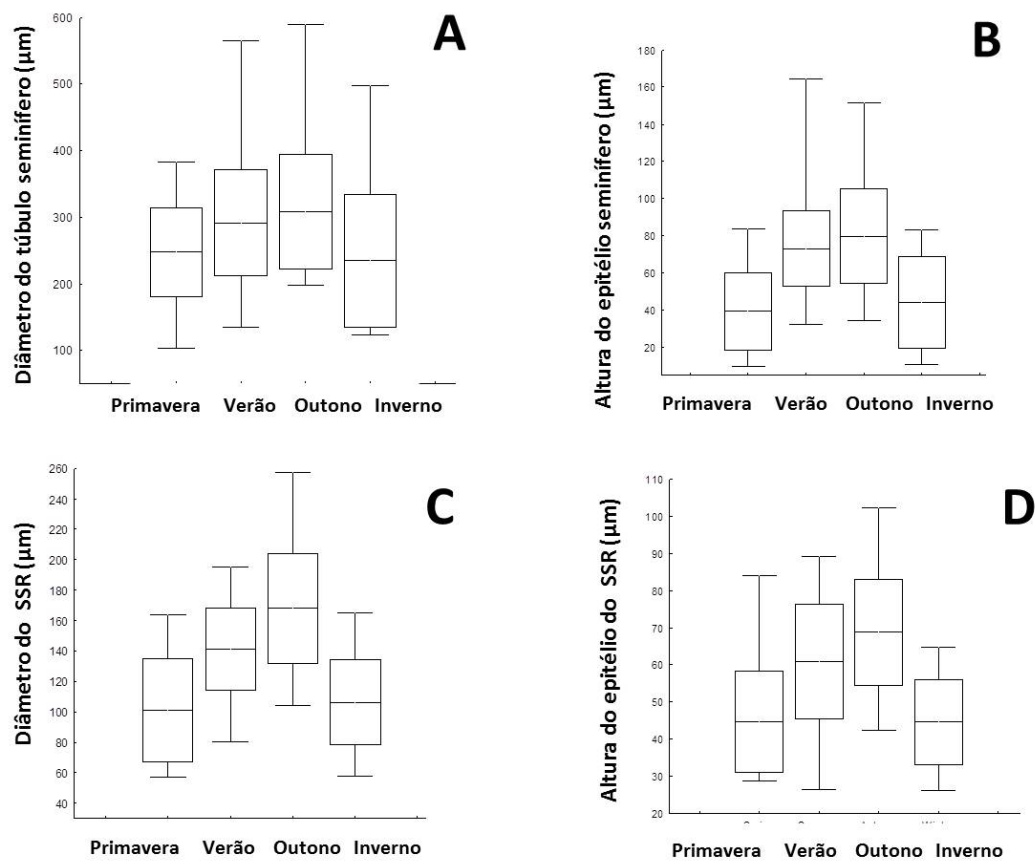


Figura 3: Variação sazonal dos parâmetros microscópicos do testículo e rim em *Bothrops pubescens*. **A.** Diâmetro do túbulo seminífero dos testículos. **B.** Altura do epitélio seminífero dos testículos. **C.** Diâmetro do segmento sexual renal (SSR). **D.** Altura do epitélio do SSR.

Tabela 1. Estágios do ciclo espermatogênico de *Bothrops pubescens*

Estágios		Estações
I	Regressão completa: somente espermatogônias e células de Sertoli	Não observado
II	Início da recrudescência: divisão das espermatogônias e espermatócitos primários	Inverno – Primavera
III	Final da recrudescência: espermatócitos e espermátides	Verão
IV	Início da espermiogênese: espermátides em metamorfose	Verão – Outono
V	Espermiogênese: espermatozóides maduros no lúmen	Verão – Outono
VI	Início da regressão: diminuição do epitélio seminífero com espermatozóides remanescentes no lúmen	Outono – Inverno-Primavera

Ciclo do ducto deferente

O diâmetro da região distal do ducto deferente não apresentou diferença entre as estações ($F= 0,2957$, $p = 0,8299$). Ductos enovelados, que indicam estocagem de esperma (cf. Almeida-Santos et al., 2006), e não enovelados foram observados ao longo de todo ano. Ductos enovelados são maiores que aqueles que não estão enovelados em *B. pubescens* (Fig. 4). Microscopicamente, a região distal da maioria dos ductos deferentes apresenta epitélio pseudoestratificado baixo com a presença de espermatozoides no lúmen (Fig. 5A), tanto na condição macroscópica de enovelamento como quando o ducto está com aspecto liso, sem nenhum sinal de enovelamento. Ductos com epitélio alto e com formação de criptas (Fig. 5B) foram observados em 7 machos, a grande maioria no período do verão (2 em fevereiro e 2 em março), mas também no outono (um em abril e um em junho) e na primavera (um em novembro). Ductos enovelados e não enovelados apresentaram esta conformação microscópica. Um indivíduo coletado em fevereiro apresentava a formação destas criptas mesmo com o ducto deferente vazio, sem nenhum espermatozoide.

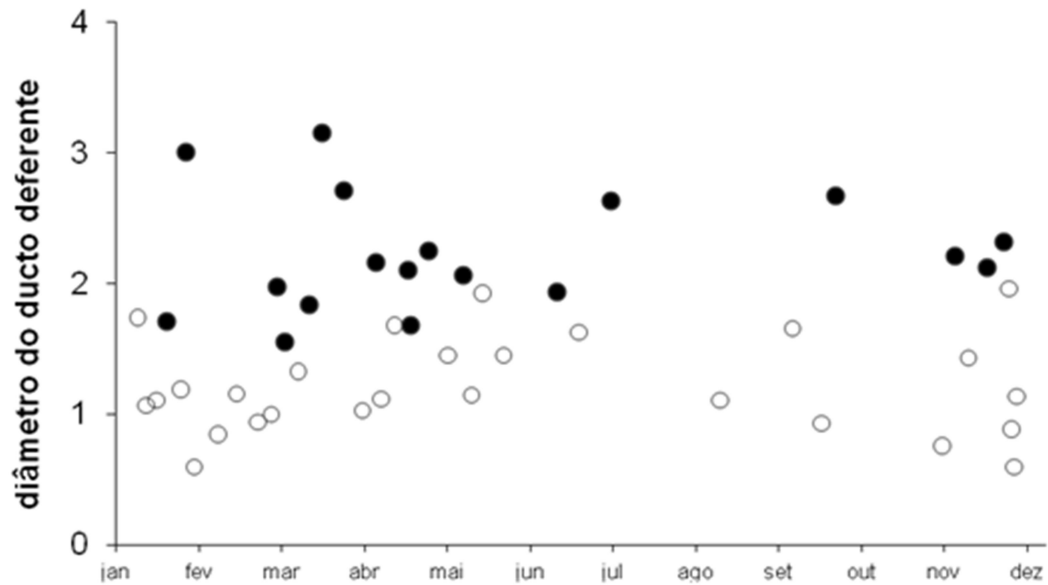


Fig. 4: Variação sazonal do diâmetro do ducto deferente em *Bothrops pubescens*. Os círculos pretos representam ductos deferentes que estão enovelados e os círculos brancos representam ductos que não estão enovelados.

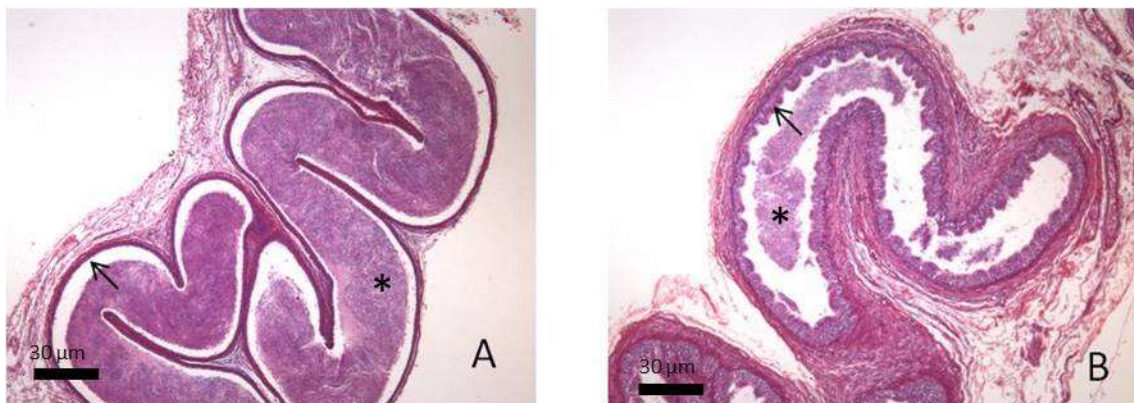


Fig. 5: Diferentes aspectos do epitélio da região distal do ducto deferente em *Bothrops pubescens*. As setas apontam para o epitélio e os asteriscos indicam os espermatozóides. A. Epitélio baixo. B. Epitélio alto com formação de criptas.

Ciclo do segmento sexual renal

Embora a hipertrofia do SSR possa ser identificada no rim de todos os machos de *B. pubescens*, a intensidade desta hipertrofia apresentou um componente sazonal, que fica evidente tanto na variação do diâmetro dos túbulos ($F= 46.7715$, $p< 0,0001$) e na altura do epitélio do SSR ($F= 33,0122$, $p< 0,0001$) (Fig. 3 C,D), quanto na variação da densidade de grânulos sexuais no epitélio do SSR (Tabela 2, Fig. 6). Ambos os parâmetros mostram a existência de um aumento de atividade do SSR durante o verão e outono, com diminuição durante a primavera e inverno (Fig. 3C, D, Tabela 2, Fig. 6). Em relação à variação sazonal do diâmetro dos túbulos do SSR e da altura do epitélio do SSR, estes parâmetros foram maiores no outono do que em todas as outras estações ($p< 0,01$). Estas variáveis também apresentaram valores significativamente maiores durante o verão em comparação com o inverno e primavera ($p< 0,01$). Não houve diferença apenas entre a primavera e o inverno. Os picos de atividade testicular e do SSR estão associados (Fig. 3).

Tabela 2. Densidade dos grânulos sexuais no epitélio do segmento sexual renal (SSR) em *Bothrops pubescens*

Escala	Diferenças visuais categorizadas	Estações
0	Sem hipertrofia	Não observado
1	Hipertrofia com poucos grânulos	Inverno – Primavera
2	Hipertrofia com grânulos evidentes espalhados pelo citoplasma	Primavera – Verão
3	Grânulos secretores visíveis na região apical do citoplasma	Outono
4	Densidade máxima de grânulos secretores no citoplasma	Verão – Outono

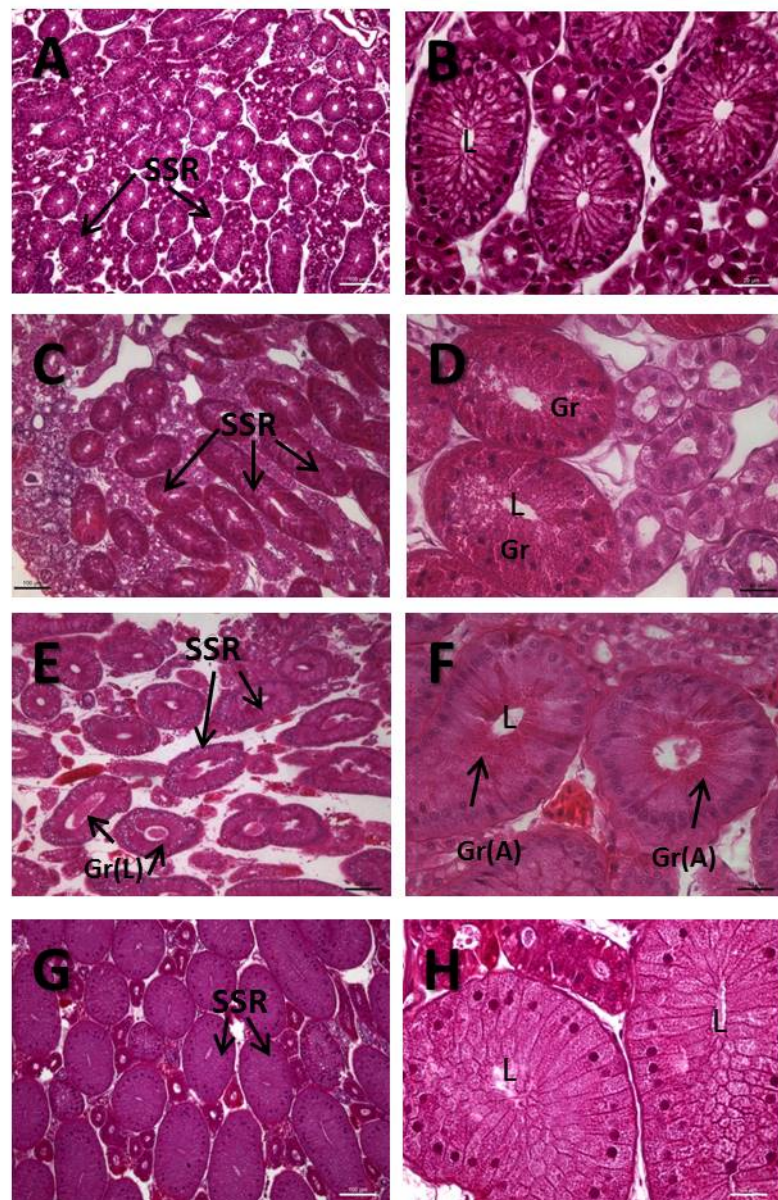


Figura 6: Ciclo do segmento sexual renal em *Bothrops pubescens*. **A. B.** Hipertrofia com poucos grânulos (estágio 1). **C.D.** Hipertrofia com grânulos evidentes espalhados pelo citoplasma (estágio 2) **E.F.** Grânulos secretores visíveis na região apical do citoplasma (estágio 3) **G.H.** Densidade máxima de grânulos secretores no citoplasma (estágio 4). SSR: segmento sexual renal, Gr: grânulos sexuais, Gr(A) grânulos sexuais na região apical do SSR, Gr(L) grânulos sexuais no lúmen dos túbulos do SSR, L: lúmen.

Relação entre as condições climáticas atuais e o estágio reprodutivo

Não houve associação significativa entre os dados climáticos (Apêndice 1) e nenhum dos parâmetros reprodutivos analisados (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados dos testes estatísticos de regressão linear entre as variáveis reprodutivas e os dados climáticos referentes ao município de procedência e mês de coleta de cada espécime.

Variáveis reprodutivas X Dados climáticos		Regressão Linear Variável dependente: média de cada variável reprodutiva por indivíduo			Regressão Linear Variável dependente: maior medida de cada variável reprodutiva por indivíduo		
		F	R ²	p	F	R ²	P
T E S T Í C U L O	Diâmetro dos túbulos seminíferos x Temp. mínima	0,7684	-0,0123	0,6038	0,2728	-0,0398	0,6133
	Diâmetro dos túbulos seminíferos x Temp. máxima	0,3994	-0,0326	0,5418	0,0623	-0,0519	0,8007
	Diâmetro dos túbulos seminíferos x Pluviosidade	0,0971	-0,0499	0,7565	0,0035	-0,0554	0,9522
	Altura do epitélio seminífero x Temp. mínima	1,0325	0,0017	0,3244	1,0056	0,0003	0,3308
	Altura do epitélio seminífero x Temp. máxima	0,1608	-0,0462	0,6949	0,2019	-0,0438	0,6622
	Altura do epitélio seminífero x Pluviosidade	0,0037	-0,0553	0,9508	0,0006	-0,0555	0,9788
S S R	Diâmetro dos túbulos SSR x Temp. mínima	0,0563	-0,0523	0,8098	0,0044	-0,0553	0,9461
	Diâmetro dos túbulos SSR x Temp. máxima	0,0318	-0,0537	0,8545	0,2603	-0,0405	0,6214
	Diâmetro dos túbulos SSR x Pluviosidade	1,9142	0,0459	0,1807	2,9593	0,0935	0,0993
	Altura do epitélio do SSR x Temp. mínima	0,0205	-0,0544	0,8825	0,1913	-0,0445	0,6702
	Altura do epitélio do SSR x Temp. máxima	0,0325	-0,0537	0,8529	0,0259	-0,0540	0,8682
	Altura do epitélio do SSR x Pluviosidade	0,2901	-0,0388	0,6025	0,0934	-0,0501	0,7607

Discussão

Os dados contrariam parcialmente a hipótese de que poderia existir uma associação entre o período de pico de produção de esperma nos testículos e a hipertrofia do SSR e as estações mais quentes do ano (verão e primavera). Por influência do clima frio do Rio Grande do Sul seria esperada uma diminuição da atividade reprodutiva durante as estações mais frias (outono e inverno). Embora o testículo e o SSR realmente estejam ativos durante o verão, o pico de atividade ocorre durante o outono. Padrão semelhante foi observado para o ciclo reprodutivo dos machos de outras espécies do grupo *B. neuwiedi* distribuídas por diferentes biomas, e consequentemente expostas a diferentes condições ambientais (obs. pess.). Espermatogênese durante o verão e outono também já foi descrita para outras espécies de serpentes da Família Viperidae da região neotropical como *Bothrops leucurus* (Barros et al., 2014) e *Crotalus durissus* do Nordeste do Brasil (Barros et al., 2012). Este padrão aponta para uma forte influência do conservatismo filogenético sobre a determinação da época de ocorrência dos eventos reprodutivos nos machos desta linhagem. Por outro lado, há também indícios de que as condições ambientais possam ter influência sobre o ciclo reprodutivo dos machos de serpentes, já que para as populações de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* de regiões com maior sazonalidade climática e clima mais frio (região sudeste do Brasil) a espermatogênese ocorre durante a primavera e verão (Salomão e Almeida-Santos, 2002, Barros et al., 2012, Almeida-Santos, 2005).

O ciclo reprodutivo dos machos de *B. pubescens* é sazonal, com concentração da produção espermática nos testículos ocorrendo em sincronia com a hipertrofia do SSR durante o verão e outono, com um forte pico no outono. O pico de hipertrofia do SSR

está associado à época de acasalamento em espécies de répteis Squamata (Bishop, 1959, Fox, 1977, Schuet et al., 2002, Aldridge et al., 2011, Rojas et al., 2013), o que indica que em vida livre o acasalamento em *B. pubescens* deva ocorrer entre o verão e outono, como em outras espécies de *Bothrops* (Almeida-Santos e Salomão, 2002, esta tese) caracterizando assim um ciclo do tipo associado (Saint-Girons, 1982). Observações de corte em vida livre ocorreram durante o mês de março (final do verão/ início do outono), porém a cópula foi observada somente em cativeiro durante o inverno (Julho e Agosto) (Hartmann et al., 2004). O controle do ambiente externo em condições de cativeiro (manipulação da temperatura, umidade e oferta abundante de alimento) pode interferir na época natural de ocorrência dos eventos reprodutivos.

Análises estatísticas demonstraram que o pico reprodutivo não está relacionado com a temperatura e pluviosidade para os machos de *B. pubescens*. Essa associação dos picos reprodutivos com os picos de temperatura ou pluviosidade já foi relatada para serpentes de regiões temperadas (Aldridge et al., 1975, Schuett et al 2013) e poderia ser esperada em *B. pubescens* em função do clima frio e sazonal no RS. De qualquer forma, podemos afirmar que esta hipótese foi parcialmente comprovada pelos picos detectados na atividade testicular e do SSR durante o verão. A primavera, embora também seja uma estação mais quente, foi uma época em que houve queda na atividade testicular e também do SSR. A amostragem de um grande número de indivíduos permitiu identificar que dentro de uma mesma estação, diferentes indivíduos da população podem apresentar testículos em diferentes estágios do ciclo espermatogênico em *B. pubescens*, o que reforça a importância das análises microscópicas para a interpretação correta do ciclo reprodutivo dos machos de serpentes (Mathies, 2011, Rojas et al., 2013, Barros et al., 2014). O tamanho do testículo não variou entre as estações, o que é um indicativo

incorreto de que a espermatogênese seja contínua durante o ano para o caso desta espécie que apresenta períodos de diminuição de atividade testicular, embora a regressão total do epitélio seminífero não tenha sido observada.

Embora haja certa variação, a ocorrência dos picos de atividade tanto no testículo quanto no rim é fortemente sazonal, o que nos permite classificar o ciclo a nível populacional como sazonal semi sincrônico (cf. Mathies, 2011) com um pico de atividade durante o verão e outono. De acordo com o nível individual desta classificação de Mathies (2011), o ciclo pode ser classificado como cíclico contínuo em relação ao testículo e o SSR, pois embora haja um forte pico durante o verão e outono, certo nível de atividade é mantido durante a primavera e o inverno, porém com grande variação do nível da atividade testicular entre os indivíduos. A maior parte dos estudos que inclui dados sobre a reprodução dos machos de serpentes da região neotropical não utiliza dados histológicos para caracterizar o ciclo testicular e tampouco considera o ciclo do SSR (Mathies, 2011). O primeiro estudo com uma espécie de serpente da região neotropical que procurou compreender a interação dos ciclos do testículo, rim e ducto deferente baseado em análises histológicas utilizou, como modelo uma espécie da Família Colubridae, *Sibynomorphus mikanii* (Rojas et al., 2013). Estes indivíduos de *S. mikanii* foram amostrados em uma região de clima tropical na região sudeste do Brasil (Rojas et al., 2013), mas apesar do tipo de clima diferente e de não serem espécies tão próximas filogeneticamente (*S. mikanii* e *B. pubescens* pertencem às Famílias Colubridae e Viperidae, respectivamente), *B. pubescens* e *S. mikanii* apresentaram o mesmo padrão de ciclo reprodutivo a nível populacional (sazonal semi-sincrônico com pico no verão e outono) e individual (contínuo cíclico). Já para *B. leucurus*, do grupo *B. atrox*, e *B. erythromelas*, uma espécie do grupo *B. neuwiedi*, filogeneticamente próxima de *B.*

pubescens, o ciclo reprodutivo dos machos teve exatamente a mesma classificação que se aplica a *B. pubescens* a nível populacional (sazonal semi-sincrônico) e diferente a nível individual, uma vez que estas serpentes possuem ciclos do tipo cíclico descontínuo a nível individual (Barros et al., 2014a,b). Por outro lado, o período do pico de atividade do testículo e SSR diferiu entre as duas espécies, uma vez que foi identificado um pico na atividade do testículo e SSR durante a primavera e verão para *B. erythromelas* (Barros et al., 2014). No entanto, como foi possível amostrar poucos indivíduos para análise histológica neste estudo com *B. erythromelas* (Barros et al., 2014), novos dados talvez possam revelar novos padrões reprodutivos para esta espécie. Outras espécies do grupo *B. neuwiedi*, incluindo *B. neuwiedi*, *B. pauloensis*, *B. mattogrossensis* e *B. marmoratus* apresentam atividade testicular concentrada durante o verão e outono, parecendo ser este o padrão para este grupo de espécies (obs. pess.). Em relação ao ciclo do SSR, *B. pubescens*, *B. marmoratus* e *B. neuwiedi* apresentaram um claro pico de hipertrofia neste mesmo período compreendido entre o verão e o outono, enquanto os dados não indicaram claramente um pico na hipertrofia do SSR para *B. mattogrossensis* e *B. pauloensis* (obs. pess.).

Em relação ao ciclo do ducto deferente, foi observado esperma estocado na porção distal deste órgão durante todo ano. Para este parâmetro, os indicadores macroscópicos (enovelamento e largura do ducto deferente) funcionaram bem por indicarem a presença de esperma nos ductos em todas as estações, conforme comprovado pelas análises histológicas. A presença de epitélio mais alto e com formação de criptas tem sido denominada como ampulla ductus deferentis (Sever, 2004, Akbarsha et al., 2005, Siegel et al., 2009) e desde então alguns trabalhos tem relatado a presença desta ampulla no ducto deferente de serpentes tanto da região temperada (veja revisão

em Trauth e Sever, 2011), quanto da região neotropical (Rojas et al., 2013, Barros et al., 2014 a,b). No entanto, a observação desta conformação no ducto deferente dos machos de serpentes da região neotropical pode ter caráter sazonal, uma vez que esta ampulla não é observada na porção distal do ducto deferente de todos indivíduos amostrados por espécie (Rojas et al., 2013, Barros et al., 2014 a,b), como também observamos para *B. pubescens*.

Dentre os répteis da linhagem Squamata, a ampulla ductus deferentis pode diferir em estrutura e função (Akbarsha et al., 2005). Uma vez que observamos indivíduos de *B. pubescens* que apresentavam a conformação de ampulla no ducto deferente totalmente vazio, sem a presença de esperma, indicamos a necessidade de desenvolver estudos utilizando técnicas de microscopia eletrônica para entender se esta conformação do ducto conhecida como ampulla poderia ter alguma função relacionada à reabsorção de esperma. Em *B. cotiara*, não somente o ducto deferente pode funcionar como órgão de estocagem de esperma: enquanto o ducto deferente funciona como um sítio de estocagem de esperma de longo prazo, o epidídimo funciona como um sítio de estocagem de esperma de curto prazo, apresentando hipertrofia logo após o pico de produção espermática nos túbulos seminíferos (Capítulo 4). Esta condição do epidídimo parece ser bastante transitória e por isso de difícil observação (Capítulo 4), fato pelo qual podemos não ter observado a hipertrofia epididimal em nenhum indivíduo amostrado neste estudo.

Um macho de *B. pubescens* com condições anatômicas do trato reprodutivo normais apresentou a presença de espermatozoides no SSR, o que nos leva a uma série de questões sobre as funções da secreção do SSR na estocagem de esperma nos machos e

até mesmo na possibilidade do SSR ser um novo sítio de estocagem de esperma em serpentes (Capítulo 3). Desta forma, concluímos que o ciclo reprodutivo dos machos de *B. pubescens* apresenta grande plasticidade em relação ao esperado para uma “serpente de clima temperado”. Esta plasticidade pode ser uma característica desta serpente generalista e pode ter influência sobre o alto sucesso reprodutivo desta espécie, que é uma das mais abundantes em comunidades de serpentes nos ecossistemas do sul do Brasil (Outeiral, 2005). Os dados apresentados aqui e no Capítulo 1 desta tese indicam que novos detalhes importantes sobre a reprodução de serpentes podem ser descobertos com a amostragem de novos indivíduos de *B. pubescens* e o uso de outras técnicas de microscopia em estudos futuros.

Referências

- Aldridge, R. D. (1975): Environmental control of spermatogenesis in the rattlesnake *Crotalus viridis*. – *Copeia*, **3**: 493-496.
- Aldridge, R. D., Jellen, B. C., Siegel, D. S., Wisniewski, S. S. (2011): The sexual segment of the kidney. In Aldridge, R.D., Sever, D.M. (Eds). Reproductive biology and phylogeny of snakes. Enfield: Science Publishers, p. 477-509.
- Almeida-Santos, S. M., Salomão, M. G. (2002): Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: Biology of the vipers, p. 445-462. Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E, Greene, H.W., Eds., Eagle Mountain, Eagle Mountain Publishing.

- Almeida-Santos, S. M. (2005): Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Almeida-Santos, S. M., Pizzatto, L., Marques, O. A. V. (2006): Intra-sex synchrony and inter-sex coordination in the reproductive timing of the Atlantic coral snake *Micrurus corallinus* (Elapidae) in Brazil. *Herpetological Journal*, **16**: 371-376.
- Akbarsha, M. A., Tamilarasan, V., Kadalmani, B., Daisy, P. (2005): Ultrastructural evidence for secretion from the epithelium of ampulla ductus deferentis of the fan-throated lizard, *Sitana ponticeriana* Cuvier. *Journal of Morphology*, **266**: 94-111.
- Araújo, F. A. A. A., Santalúcia, M. e Cabral, R. F. (2003): Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In Cardoso et al. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Sarvier, São Paulo.
- Barros, V. A., Sueiro, L. R. e Almeida-Santos, S. M. (2012): Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of phylogenetic conservations of reproductive patterns. – *Herpetological Journal*, **22**: 97-104.
- Barros, V. A., Rojas, C. A., & Almeida-Santos, S. M. (2014): Is rainfall seasonality important for reproductive strategies in viviparous Neotropical pit vipers? A case study with *Bothrops leucurus* from the Brazilian Atlantic Forest. *Herpetological Journal*, **24**: 41-49.
- Barros, V. A., Rojas, C. A. e Almeida-Santos, S. M. 2014b. Reproductive Biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. - *Advances in Zoology*, **2014**: 1-11.

Barros, V. A., Rojas, C. A., and S. M. Almeida-Santos. Capítulo 2. Mating plugs and male sperm storage in *Bothrops cotiara* (Serpentes, Viperidae). Manuscrito para o Herpetological Journal.

Bishop, J.E. (1959): A histological and histochemical study of the kidney tubule of the common garter snake, *Thamnophis sirtalis*, with special reference to the sexual segment in the male. - Journal of Morphology, **104**: 307-357.

Bochner, R. & Struchiner, C.J. (2003): Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. - Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 19(1):7-16.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. (2004): The venomous reptiles of the Western Hemisphere. New York: Cornell University Press.

Fox, W. (1977): The urogenital system of reptiles. In Gans, C. & Parsons, T.S. (eds.). Biology of the reptilian, vol 6, Academic Press, New York, p. 1-157.

Gibbons, J. W. e Semlitsch, R. D. (1987): Activity patterns. In Seigel, R. A., Collins, J. T. e Novak, S. S. (Eds.) Snakes: ecology and evolutionary biology, pp. 184-209. McGraw-Hill, New York.

Goldberg, S. R. and Parker, W. S. (1975): Seasonal testicular histology of the colubrid snakes, *Masticophis taeniatus* and *Pituophis melanoleucus*. - Herpetologica, **31**: 317-322.

Hartmann, M.T., Marques, O.A.V., Almeida-Santos, S.M. (2004): Reproductive biology of the southern Brazilian pitviper *Bothrops neuwiedi pubescens* (Serpentes, Viperidae). - Amphibia Reptilia **25**: 77-85.

Hartmann, M. T., Hartmann, P. A., Cechin, S. Z. e Martins, M. (2005): Feeding habits and habitat use in *Bothrops pubescens* (Viperidae, Crotalinae) from Southern Brazil. - Journal of Herpetology **39**: 664-667.

- Krohmer, R.W. (2004): Variation in seasonal ultrastructure of sexual granules in the renal sexual segment of the Northern Water Snake, *Nerodia sipedon sipedon*. - Journal of Morphology, **261**: 70-80.
- Maluf, J.R.T. (2000): Nova classificação climática do Estado do Rio Grande do Sul. - Revista Brasileira de Agrometeorologia, **8**: 141-150.
- Mathies, T. (2011): Reproductive cycles of tropical snakes. In Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes, R. D. Aldridge and D. M. Sever, Eds., Science Publishers, Enfield, NH, USA.
- Mendonça, F.; Danni-oliveira, I. M. (2007): **Climatologia**: noções básicas e climas do Brasil. São Paulo: Oficina de Textos.
- Nori, J, Carrasco, P.A., Leynaud, G.C. (2014): Venomous snakes and climate change: ophidism as a dynamics problem. - Climatic Change, **122**: 67-80
- Outeiral, A.B (2005): História natural de uma comunidade de serpentes da Serra do Sudeste do Rio Grande do Sul, Brasil. Tese de doutorado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.
- Rojas, C.A., Barros, V.A. & Almeida-Santos, S.M. (2013): The reproductive cycle of the male sleep-snake *Sibynomorphus mikanii* (Schlegel, 1837) from southeastern Brazil. - Journal of Morphology **274**, 215-228.
- Saint-Girons, H. (1982): Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycles. - Herpetologica **38**, 5-16.
- Schuett, G.W., Carlisle, S.L., Holycross, A.T., O'Leile, J.K., Hardy, D.L., Van Kirk, E.A., Murdoch, W.J. (2002): Mating system of male Mojave rattlesnakes (*Crotalus scutulatus*): seasonal timing of mating, agonistic behavior, spermatogenesis, sexual segment of the

kidney, and plasma sex steroids. In: Biology of the vipers, p. 515-532. Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E, Greene, H.W., Eds., Eagle Mountain, Eagle Mountain Publishing.

G. W. Schuett, R. A. Repp, S. K. Hoss, and H. W. Herrmann. (2013): Environmentally cued parturition in a desert rattlesnake, *Crotalus atrox*. - Biological Journal of the Linnean Society, vol.110, no.4, pp. 866 – 877, 2013.

Siegel, D.S., Sever, D.M., Rheubert, J.L., Gribbins, K.M. (2009): Reproductive biology of *Agkistrodon piscivorus* Lacépède (Squamata, Serpentes, Viperidae, Crotalinae). – Herpetological Monographs, **23**: 74-107.

Sever, D.M. (2004): Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). IV. Occurrence of an ampulla ductus deferentis. Journal of Morphology, **262**: 714-730.

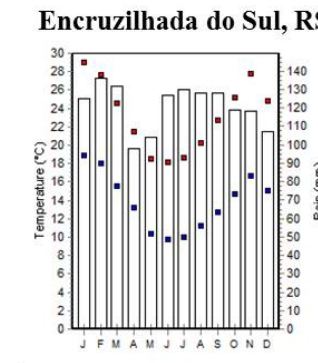
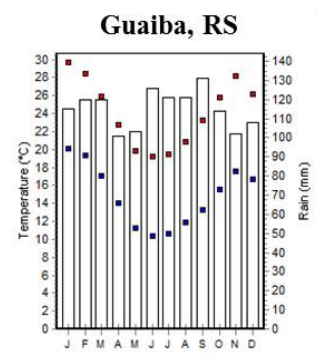
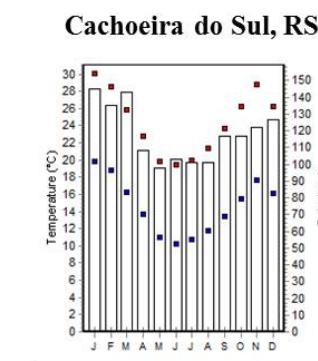
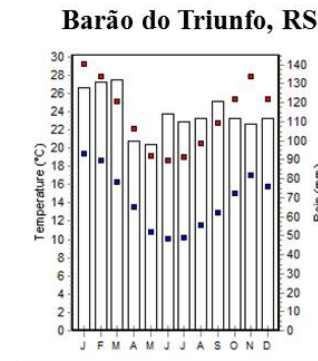
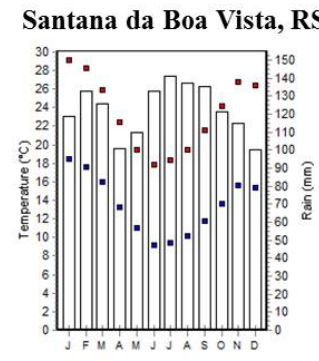
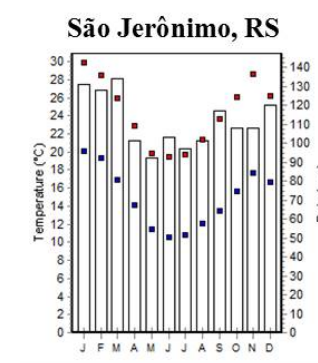
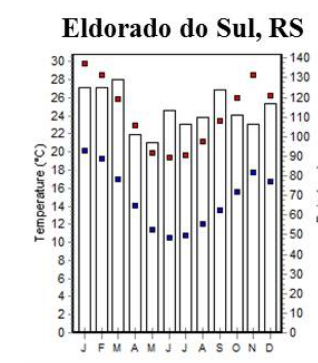
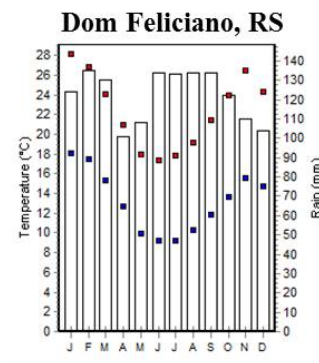
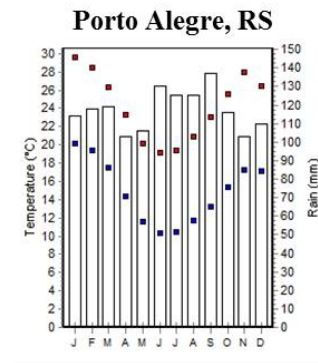
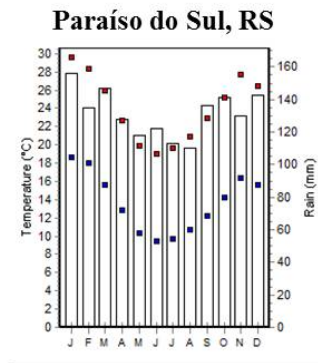
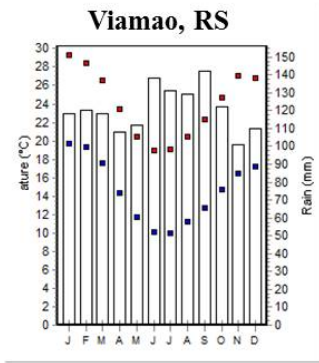
Trauth, S.E., Sever, D.M. (2011): Male urogenital ducts and cloacal anatomy. In: Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes, p. 411-475. Aldridge, R.D., Sever, D.M., Eds., Enfield, Science Publishers.

Volsøe, H. (1944): Structure and seasonal variation of the male reproductive organs of *Vipera berus*. Spolia Zool Mus Hauniensis, **5**:1-157.

Apêndice 1. Relação dos indivíduos amostrados para análise histológica do trato reprodutor masculino por município e respectivos dados climáticos referentes à média de cada parâmetro no mês de coleta do animal. Os dados climáticos foram obtidos a partir da base de dados Wordclim com o auxílio do programaDIVA-GIS.

Espécime	Procedência (Município)	Mês de coleta	Temperatura mínima	Temperatura máxima	Pluviosidade
PUC 7418	Paraíso do Sul, RS	08/09/1995	12,2	22,9	136
PUC 8978	Porto Alegre, RS	04/09/1997	13,2	23,1	137
PUC 13881	Dom Feliciano, RS	30/07/2001	9,2	17,8	133
PUC 9038	Eldorado do Sul, RS	04/1997	14,1	22,9	101
PUC 10592	Viamão, RS	21/05/1998	11,7	20,4	112
PUC 13850	Dom Feliciano, RS	05/05/1998	9,9	18	108
PUC 13851	Dom Feliciano, RS	28/03/2001	15,3	24,1	130
PUC 16120	São Jerônimo, RS	01/04/2005	14,1	22,9	101
PUC 18195	Viamão, RS	10/04/2007	14,3	23,4	108
PUC 13852	Dom Feliciano, RS	01/05/2002	9,9	18	108
PUC 9095	Santana da Boa Vista, RS	30/09/1997	11,8	21,5	135
PUC 11409	Viamão, RS	20/12/1999	17,2	26,8	110
PUC 13849	Dom Feliciano, RS	12/11/2001	15,6	26,5	110
PUC 13882	Dom Feliciano, RS	29/11/1996	15,6	26,5	110
PUC 8957	Encruzilhada do Sul, RS	12/96	15,1	24,8	107
PUC 17730	São Jerônimo, RS	15/11/2005	17,7	28,6	108
PUC 3246	Barão do triunfo, RS	01/01/1989	19,4	29,2	128
PUC 7417	Cachoeira do Sul, RS	04/03/1996	16,3	25,9	143
PUC 9082	Guaíba, RS	27/02/1997	19,3	28,4	120
PUC 11446	Viamão, RS	08/01/2000	19,7	29,3	118
PUC 13854	Dom Feliciano, RS	06/03/2001	15,3	24,1	130
PUC 14185	Dom Feliciano, RS	11/01/2001	18,1	28,1	124
PUC 14188	Dom Feliciano, RS	11/01/2001	18,1	28,1	124
PUC 13867	Dom Feliciano, RS	05/02/2001	17,5	26,8	135
PUC 9089	Viamão, RS	17/03/1997	17,6	26,6	118
PUC 13879	Dom Feliciano, RS	20/01/2001	18,1	28,1	124

Apêndice 2. Climatogramas de municípios amostrados.



Capítulo 3

First observation of sperm in the sexual segment of the
kidney of a snake

Manuscrito submetido para o periódico Herpetological Review

The development of the male reproductive system is associated with the kidneys and urinary ducts in basal vertebrates. Sperm pass through the kidneys in lungfishes and some ducts transport both urine and sperm in some lineages of fish and amphibians (Sadleir 1973). The evolution of separate ducts to transport sperm and urine may be linked to the toxicity of concentrated urine to sperm. The passage of spermatozoa and urine to the exterior always occurs through separate ducts in more derived groups of vertebrates (reptiles, birds and mammals) (Sadleir 1973).

In vertebrates, a reproductive function in the kidneys may have evolved independently three times: in a group of fishes, Urodela amphibians and squamate reptiles (Aldridge et al. 2011). Snakes, lizards and amphisbaenians have a specialized portion of the nephron which depends on testosterone levels to become hypertrophied and secretory: the sexual segment of the kidney (SSK). Many functions have been proposed for SSK secretions including sperm nutrition and activation, lubrication during copulation, and formation of a gelatinuous copulatory plug that males deposit in females vagina during copulation (Bishop 1959; Fox 1977; Aldridge et al. 2011). Regaud and Policard (1903) were the first to propose a reproductive function for the SSK and they also suggested that SSK secretions become mixed with urine and sperm in the cloaca. Volsøe (1944) proposed that if sperm is mixed to SSK secretions in the male reproductive tract, then it would occur in the ampulla of the ureter and not in the cloaca because the ductus deferens unites the ureter before opening into the cloaca. Here, we present the first report of sperm in the SSK of a snake species and discuss some questions associated to this unexpected observation.

After dissection and macroscopic evaluation of the male urogenital tract (testes, ductus deferens, kidneys and ureters), we conducted histological analysis of 46 males of

Bothrops pubescens (Serpentes, Viperidae) for a broader study about reproduction of this snake species (V. A. Barros, unpublished data). *Bothrops pubescens* is a pitviper that inhabits deciduous forests of southern Brazil and Uruguay. Here, we report the discovery of sperm in the urinary tract of a male *B. pubescens* (MCT 16124). This specimen is held in the zoological collection “Museu de Ciência e Tecnologia” (MCT) of Pontifícia Universidade Católica (PUC) in Rio Grande do Sul State (RS). It was collected in June, 10th, 2005 (autumn season) at São Jerônimo city (29° 57’ 32” S, 51° 43’ 19” W), RS, Brazil.

We also recorded data about the snake size (snout vent length - SVL) and sexual maturity using the presence of sperm in the ductus deferens or testes as a criterion to consider the individual as sexually mature. The kidneys were preserved in 70% alcohol and processed for light microscopy by the paraffin method. Sections taken at 5 µm were stained with hematoxylin and eosin (H/E). Images of the slides were obtained via Image-Pro Express Olympus Program.

No signs of abnormalities were detected in the macroscopic examination of the urogenital tract of the male *B. pubescens* (MCT 16124). This male was sexually mature (presence of sperm in the ductus deferens) and it measured 63 cm SVL. The kidneys showed normal conditions of nephron regions, including the Bowman’s capsule, proximal convoluted tubules, distal convoluted tubules (SSK) and the collecting ducts (Fig. 1A). The epithelium of the SSK consisted of high and narrow cells presenting well-defined boundaries (Fig. 1B). The nucleus lied near the base of these cells and the cytoplasm was filled with eosinophilic secretion granules, showing that the SSK was hypertrophied and at the secretory stage at this season (autumn) (Fig. 1B, C). The lumen of the SSK was visible and it was partially filled with some secretion from the cells and an uncommon presence of sperm (Fig. 1B, C). Histological sections of the ureter also showed the

presence of sperm in the lumen (Fig. 1D). The ductus deferens wall was intact and completely separated from the ureter. (Fig. 1D). Sperm involved in a mass was present in the lumen of the ductus deferens (Fig. 1D).

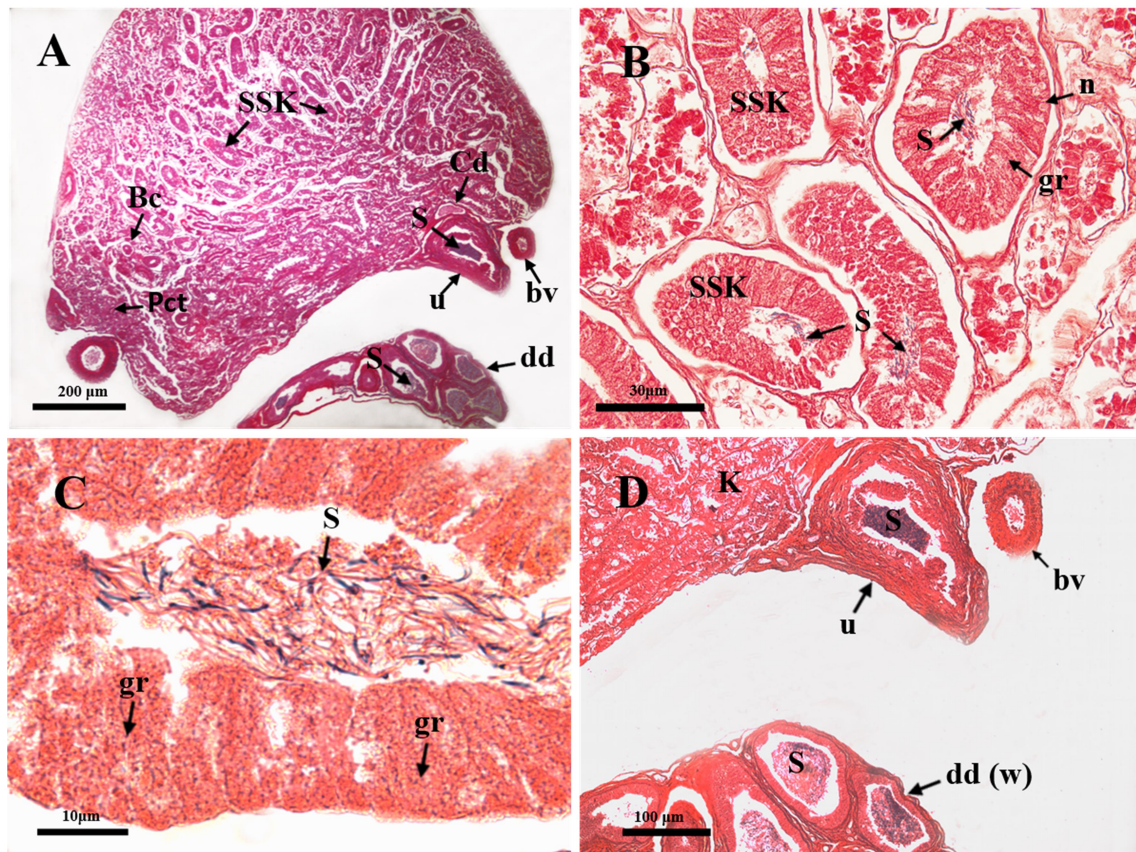


Fig. 1. Presence of sperm in the kidneys (SSK), ureter and ductus deferens of *B. pubescens*. A. Overview of the cranial portion of the kidney, showing some regions of the nephron (normal condition). B. Presence of sperm in the tubules of the SSK. C. Higher magnification of spermatozoa in the lumen of SSK tubules (full of granules). D. Presence of sperm in the lumen of the ureter and ductus deferens. Bc: Bowman's capsule, Pct: proximal convoluted tubule, Cd: collecting duct, SSK: sexual segment of the kidney,

U: ureter, S: sperm, Bv: blood vessels, dd: ductus deferens, gr: secretory granules, n: nucleus, K: kidney, dd (w): ductus deferens (wall).

The discovery of sperm inside the kidneys, especially in the SSK, challenges us to think about many questions about reproduction including physiology of sperm and sperm storage in snakes. This male was sampled during autumn, simultaneously to peak spermatogenesis (Barros et al. unpublished data) and mating season (Almeida-Santos and Salomão 2002). Thus, abundant sperm would be exiting the ductus deferens at that time. The presence of sperm was observed in the ampulla ureter of viperids (Volsøe 1944; Trauth and Sever 2011; Siegel et al. 2011). The ampulla ureter is located at the distal portion of the ureter, it is larger than the ureter and it communicates the ductus deferens and the ureter to the urodaeum, which is the part of the cloaca into which the ureters and the genital ducts empty (Volsøe 1944; Trauth and Sever 2011; Siegel et al. 2011). One possibility is that sperm in the ampulla ureter ascended the ureter in this male of *B. pubescens*. However, if urine is toxic to sperm, and the ureter transports urine, how would sperm survive to ascend the ureter and reach the SSK? The SSK passes secretions into the ureter (Trauth and Sever 2011), thus it is possible that the presence of these secretions in the ureter provided the physiological conditions for sperm to ascend the ureter and reach the kidneys.

Considering that SSK secretions are a source of energy for spermatozoa while sperm storage occurs in the female reproductive tract (Bishop 1959), would the SSK be a new sperm storage site or even a nourishment site for sperm in male snakes? Why did sperm move into the SSK? Would it be attracted to the tubules by SSK secretions? Also, SSK secretions are responsible for the formation of the mating plug in snakes, a reproductive

tactic recently discovered for *Bothrops* species (Almeida-Santos and Kasperoviczus unpublished data, Barros et al. in press). Thus, the discovery of sperm in the SSK makes us to question if the mating plug would also house sperm and function as a spermatophore as previously reported for another snake species, *Thaminophis sirtalis* (Friesen et al. 2013). Considering that the discovery of sperm in the SSK of this male allow us to hypothesize that the SSK may be a sperm storage site, would this phenomenon not occur in all individuals of the species and thus represent an expression of an alternative reproductive tactic? Variation on reproductive traits among conspecific individuals has been documented in several taxa (Gross 1996). The alternative solutions that conspecific individuals apply to achieve fertilization and successful reproduction are considered as alternative reproductive tactics (ART) (Taborsky et al. 2008).

Although ART usually involves behavioral traits, morphological traits may also be considered in the context of ART like the male genitalia that may be present or absent in snails (Doums et al. 1998; Taborsky et al. 2008). Species that show high reproductive investments may show size variation between individuals pursuing different reproductive tactics (Taborsky and Brockmann 2010). Size of sexually mature males of *B. pubescens* is highly variable (38 to 83 cm SVL) (Hartmann et al. 2004) and male-male combat behavior occurs in some *Bothrops* species (Almeida-Santos and Salomão 2002). Although male-male combat has never been reported for *B. pubescens*, interactions between males at time of mating described (agonistic behavior between two males followed by female courtship) have been observed for *B. pauloensis*, a related species of *B. neuwiedi* group (Silva et al. 2013). Some information on the reproductive biology of *B. pubescens* is available (Hartmann et al. 2004), however data presented herein shows that further studies are needed. Future studies on the reproduction of male *B. pubescens* should

address on the reproductive behavior of this species during the mating season, aiming to look for intraspecific differences among male strategies considering different classes of male size. A correlation between the presence of sperm or not in the SSK and differences in the reproductive success of individuals applying different tactics of sperm storage or nutrition (passage of sperm or not through the SSK) should also be investigated considering if these different tactics would represent differences in the fitness of individuals. Finally, it would be very interesting if these studies included an investigation of the endocrine mechanisms that may be influencing behavioral and morphological variation (Knapp 2004). However, because this phenomenon was observed in only one individual, we must also consider that this may represent only an exception.

Acknowledgments

We thank Glaucia M. F. Pontes (MCT – PUC) for allowing access to *B. pubescens* individuals; C. Jared and M. Antoniazzi for kindly allowing the use of equipment in the Laboratory of Cell Biology (Butantan Institute). This work was supported by CAPES and FAPESP (2012/15037-4).

Literature cited

Aldridge, R. D., Jellen, B. C., Siegel, D. S., and S. S. Wisniewski. 2011. The sexual segment of the kidney. In R. D. Aldridge, and D. M. Sever (eds.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*, pp. 477-509. Science Publishers, Enfield, Connecticut.

Almeida-Santos, S. M., and M.G. Salomão. 2002). Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In G. W. Schuett, M. Höggren, M. E.

- Douglas, and H. W. Greene (eds.), *Biology of the Vipers*, pp. 445-462. Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain, Utah.
- Barros, V. A., Rojas, C. A., and S. M. Almeida-Santos. Mating plugs and male sperm storage in *Bothrops cotiara* (Serpentes, Viperidae). *Herpetol. J.* (in press).
- Bishop, J. E. 1959. A histological and histochemical study of the kidney tubule of the common garter snake, *Thamnophis sirtalis*, with special reference to the sexual segment in the male. *J. Morphol.* 104: 307-357.
- Doums, C., Viard, F., and P. Jarne. 1998. The evolution of phally polymorphism. *Biol. J. Linn. Soc.* 64: 273-296.
- Fox, W. 1977. The urogenital system of reptiles. In C. Gans, and T. S. Parsons (eds.) *Biology of the Reptilia*, pp. 1-157. Academic Press, New York, New York.
- Friesen, C. R., Shine, R., Krohmer, R. W., and R. T. Mason. 2013. Not just a chastity belt: the functional significance of mating plugs in garter snakes, revisited. *Biol. J. Linn. Soc.* 109: 893-907.
- Gross, M.R. 1996. Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes. *Trends Ecol. Evol.* 11: 92-98.
- Hartmann, M. T., Marques, O. A. V., and S. M. Almeida-Santos. 2004. Reproductive biology of the southern Brazilian pitviper *Bothrops neuwiedi pubescens* (Serpentes, Viperidae). *Amphibia-Reptilia* 25: 77-85.
- Knapp, R. 2004. Endocrine mediation of vertebrate male alternative reproductive tactics: the next generation of studies. *Integr. Comp. Biol.* 43: 658-668.
- Regaud, C., and A. Policard. 1903. Recherches sur la structure du rein de quelques ophidiens. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 6: 191-282.

- Sadleir, R. M. F. S. 1973. The reproduction of vertebrates. 1st ed. Academic Press, New York, New York. 227 pp.
- Siegel, D. S., Trauth, S. E., Sever, D. M., and R. D. Aldridge. 2011. The phylogenetic distribution of the ampulla ureter and ampulla urogenital/ uriniferous papilla in the Serpentes. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 49: 160-168.
- Silva, K. M. P., Sueiro, L. R., Galassi, G. G., and S. M. Almeida-Santos. 2013. Reprodução de *Bothrops* spp. (Serpentes, Viperidae) em criadouro conservacionista. *Vet. e Zootec.* 20: 632-642.
- Taborsky, M., and H. J. Brockmann. 2010. Alternative reproductive tactics and life history phenotypes. In P. Kappeler (ed.), *Animal Behaviour: Evolution and Mechanisms*, pp. 537-586. Springer, Berlin, Berlin.
- Taborsky, M., Oliveira, R. F., and J. Brockmann. 2008). The evolution of alternative reproductive tactics: concepts and questions. In R. F. Oliveira, M. Taborsky, and J. Brockmann (eds.), *Alternative Reproductive Tactics an Integrative Approach*, pp. 1-21. Cambridge University Press, New York, New York.
- Trauth, S. E., and D. M. Sever. 2011. Male urogenital ducts and cloacal anatomy. In R. D. Aldridge, and D. M. Sever (eds.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*, pp. 411-475. Science Publishers, Enfield, Connecticut.
- Volsøe, H. 1944. Structure and seasonal variation of the male reproductive organs of *Vipera berus* (L.). *Spolia Zool. Mus. Hauniensis* 5: 1-157.

Capítulo 4

Mating plugs and male sperm storage in *Bothrops cotiara*

(Serpentes, Viperidae)

Manuscrito ("Short Note") aceito para publicação no periódico *Herpetological Journal*

ABSTRACT

We describe two new aspects of male reproduction in the pit viper *Bothrops cotiara*: the formation of mating plugs and epididymal sperm storage. We propose that long-term sperm storage occurs in the ductus deferens, whereas macroscopic hypertrophy indicates that the epididymis may be a short-term sperm storage site. Secretions of the sexual segment of the kidneys probably form the mating plug that males deposit in the female vagina during copulation. A mating plug without sperm was observed in the spring. Future studies should address the functions and longevity of mating plugs and the role of the epididymis in *Bothrops* reproduction.

Key words: snakes; reproduction; SSK; ductus epididymis; ductus deferens; neotropical region

Male snakes have a complex reproductive system that includes sperm storage (Trauth & Sever, 2011) and a sexual segment of the kidney (SSK) that produces secretory granules in response to testosterone (Bishop, 1959; Aldridge et al., 2011). An increase in the production of secretory granules with a consequent hypertrophy of the tubules in the SSK during the mating season may have evolved to enhance male reproductive success after mating, including the formation of a mating plug which males deposit in the female genital opening after copulation (Aldridge et al., 2011).

Mating plugs have evolved independently in a variety of taxa including invertebrates such as spiders (Uhl et al., 2010), scorpions (Althaus et al., 2010), shrimp (Bauer & Min, 1993), and nematodes (Cutter, 2008), and in primates (Parga et al., 2006),

lizards (Bosch, 1994; Moreira et al., 2006, 2007) and snakes (Crews & Garstka, 1982; Shine et al., 2000; Friesen et al., 2013). In squamates, the functions of mating or copulatory plugs may include passive mate-guarding (Shine et al., 2000), the prevention of sperm leakage (Moreira & Birkhead, 2004) and the gradual release of spermatozoa (spermatophore) (Friesen et al., 2013).

Sperm storage is also a component of the female and male reproductive systems of snakes (Fox, 1956; Almeida-Santos et al., 2006; Trauth and Sever, 2011; Rojas et al., 2013; Rojas et al. 2015). Sperm storage can be categorized as long-term (LTSS, sperm is stored in the oviducts for prolonged periods prior to ovulation) and short-term (STSS, sperm is stored for some weeks prior to ovulation) (Schuett, 1992). The ductus deferens is the acknowledged sperm storage organ for male snakes (Fox, 1952; Almeida-Santos et al., 2004; Trauth & Sever, 2011). Sperm is produced in the seminiferous tubules in the testes before the anterior testicular ducts (including the rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymis) transport the sperm to the ductus deferens (Trauth & Sever, 2011). While the epididymis is used for sperm storage, maturation and capacitation in turtles and lizards (Gist et al., 2002; Bian et al., 2013, Stuart-Smith et al., 2005), its function as a sperm storage organ in snakes is still unclear (Dufaure & Saint-Girons, 1984). Recently, Sever (2010) and Sever and Freeborn (2012) detected the existence of secretory activity in the ductus epididymis of snakes, which may be indicative of a sperm storage function.

The aim of this paper is to describe for the first time the following components of the male reproductive repertory of the Neotropical pit viper, *Bothrops cotiara* (Gomes, 1913): the formation of mating plugs, and occurrence of sperm storage in the epididymis.

Bothrops cotiara belongs to the basal *B. alternatus* group (Wüster et al., 2002, Carrasco et al, 2012) and is endemic to the Araucaria forests in the Brazilian Meridional Plateau, ranging from South São Paulo to the North Rio Grande do Sul, extending into Argentina (Campbell & Lamar, 2004). Due to recent range contractions, *Bothrops cotiara* is considered locally endangered (São Paulo, 2008; Mikich & Bérnils, 2004). Information on its biology is scarce, and an urgent need exists for more natural history information to support conservation efforts (Mikich & Bérnils, 2004; Bressan et al., 2009). *Bothrops cotiara* preys only on small mammals, whereas most other *Bothrops* species are diet generalists (Martins et al., 2002); the clutch size varies from 4 to 12 new-borns (Mikich & Bérnils, 2004).

We analysed four males and three females of *B. cotiara* from two scientific collections: Museu de Ciências e Tecnologia (MCT), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) and Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS). All individuals were sexually mature. Individuals were collected in Paraná and Santa Catarina States (Appendix 1). To search for evidence of mating plugs, the reproductive tracts of three females were analysed.

A ventral incision was made to analyse the reproductive tract of the animal. The convoluted aspect of the ductus epididymis and ductus deferens was used as a macroscopic indicator of sperm storage in males (Almeida-Santos et al., 2006). After macroscopic examination, the testes, kidneys and the caudal portion of the ductus deferens of males and the vaginas of females were collected for histological analysis. All organs were preserved in 70% alcohol and processed for light microscopy by the paraffin method. Sections were cut 5 µm thick, and stained for histology with hematoxylin and eosin (H/E) (Spector & Goldman, 2006).

A mating plug was observed in one vitellogenic female (largest follicle: 13.76 mm diameter, MCT 17498) collected in spring. Macroscopically, we observed a white to yellowish gelatinous mass occluding the female vagina. Microscopically, this mating plug was distributed throughout the lumen of the vagina (Fig. 1A). The epithelium of the vagina was composed of secretory and ciliated cells, and the lamina propria showed many mastocytes (Fig. 1B). Sperm was not observed in the mating plug or in the vagina of any sampled female. The SSK, which produces the mating plug substances, was present in the kidneys of the male *B. cotiara*. The active condition of the SSK in summer and autumn was characterized by a high production of sexual granules with evident hypertrophy of the nephron distal tubules (Fig. 1C), differing from the inactive period in winter (Fig. 1D).

In males, after spermatozoa are produced in seminiferous tubules in summer, they pass through a system of ducts (Fig. 1 E,F). The rete testis epithelium is simple squamous and cuboidal and non-ciliated, and it communicates to the ductuli efferentes, which are smaller in diameter and contain simple cuboidal epithelium with ciliated and non-ciliated cells (Fig. 1 E, F). Sperm was observed in the lumen of the rete testis and ductuli efferentes in every male sampled. During spermatogenesis in summer, the ductus epididymis was empty and invisible to the naked eye (Fig. 1F), whereas in autumn, when it contained a large amount of sperm, the ductus epididymis was macroscopically visible and showed a convoluted aspect (Figs. 1E,G,H). The epithelial cells of the ductus epididymis were high with basal nuclei in the summer (Fig. 1F), whereas the epithelium of the hypertrophied ductus epididymis was low in autumn (Fig. 1E). In winter, the ductus epididymis was not macroscopically visible, and only a few spermatozoa could be observed. Sperm was stored throughout the seasons in the ductus deferens (Fig. 1I). The

distal portion of the ductus deferens contained many spermatozoa in all sampled individuals regardless of the testes condition (whereas spermatogenesis occurred in the summer, regression of the seminiferous epithelium occurred in autumn and winter). The epithelium of the ductus deferens was low and pseudostratified, and the spermatozoa were surrounded by a mass (Fig. 1G).

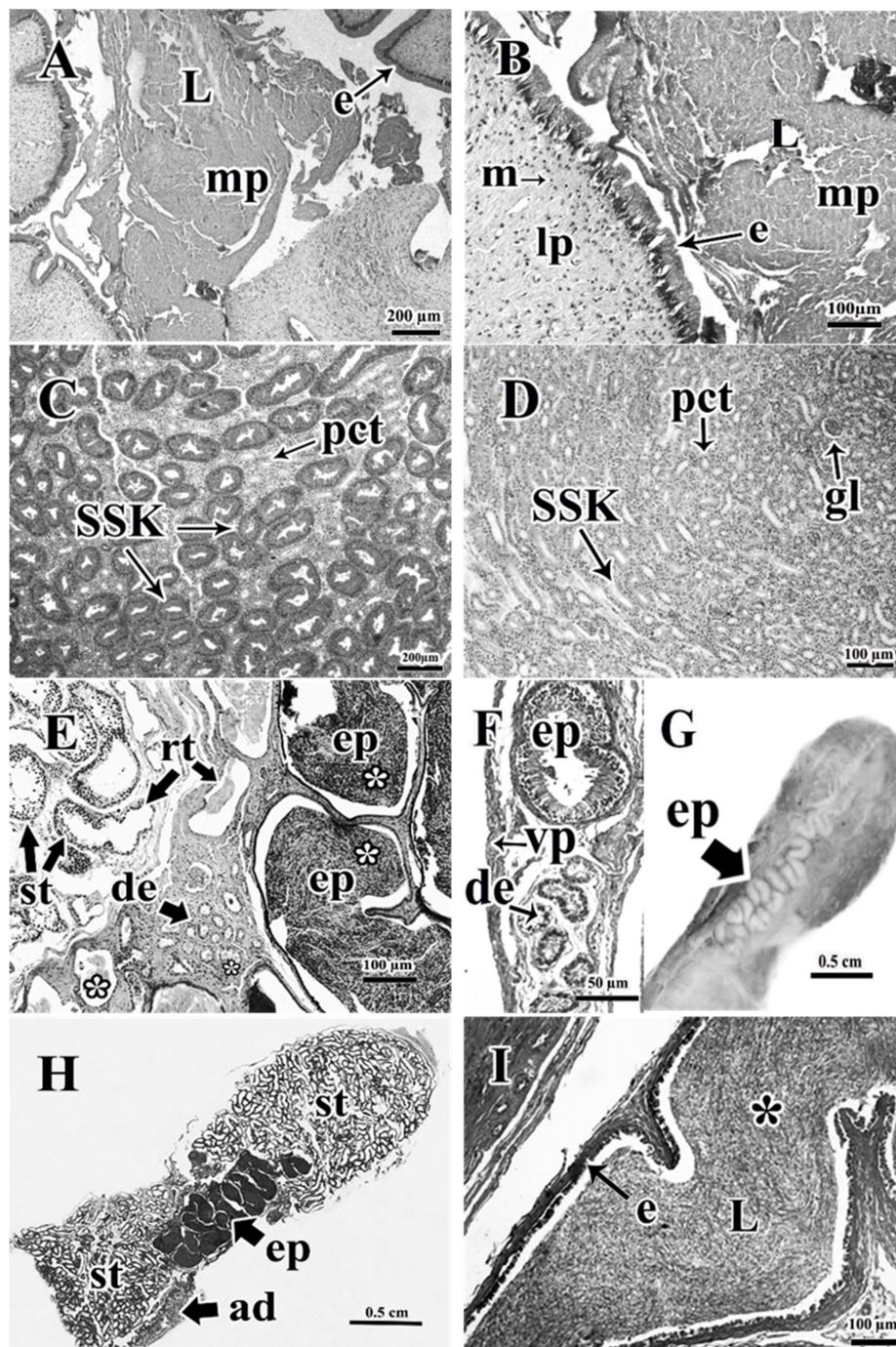


Fig. 1. A. Mating plug in female vagina during spring. **B.** Higher magnification of A showing the epithelium of the vagina and the presence of mastocytes. **C.** Active SSK in summer and autumn. **D.** Inactive SSK in winter. **E.** Anterior testicular ducts with epididymal hypertrophy in autumn. **F.** Anterior testicular ducts with empty ductus epididymis in summer. **G.** Macroscopic aspect of the testes with the epididymal hypertrophy. **H.** Microscopic view of the testes showing the hypertrophied ductus epididymis and the position of the adrenal. **I.** Sperm storage in the ductus deferens. ad: adrenal; de: ductuli efferentes; e: epithelium; ep: ductus epididymis; gl: glomerulus; m: mastocytes; mp: mating plug; lp: lamina propria; L: lumen; pct: proximal convoluted tubule; st: seminiferous tubules; rt: rete testis; *: sperm; vp: visceral pleuroperitoneum; SSK: sexual segment of the kidneys.

This is our first observation of a macroscopic hypertrophy in the ductus epididymis of a snake. We propose that, after a peak of sperm production in summer, *B. cotiara* males release spermatozoa to the ductus epididymis for a period of STSS, resulting in macroscopic hypertrophy before the sperm is released to the ductus deferens for LTSS, where sperm is stored throughout the year (e.g. Rojas et al., 2013; Barros et al., 2014). Sperm storage in the epididymis has been reported for other reptiles (e.g., turtles and lizards) with macroscopically visible epididymal hypertrophy (Bian et al., 2013; Stuart-Smith et al., 2005). Descriptive evidence also exists for a macroscopically convoluted and hypertrophied epididymis and/or its function as a sperm storage site in the snakes *Vipera berus* (Volsøe, 1944), *Zaocys dumnades* (Gang et al., 2011), and *Naja kaouthia* (Tumkiratiwong et al., 2012). Recent analyses using electron microscopy techniques in

Seminatrix pygaea and *Pelamis platurus* indicate that secretory activity occurs in the epididymis of the snakes (Sever, 2010; Sever & Freeborn, 2012; but see also Dufaure and Saint-Girons (1984). Thus, the function of the epididymis in snakes may vary among the different species, and might be more similar to other amniotes than previously thought (Trauth & Sever, 2011).

The sperm storage period may be linked to seasonal hypertrophy of the SSK in snakes (Saint-Girons & Pfeffer, 1971). In *B. cotiara*, sperm storage in the epididymis was indeed synchronous to SSK hypertrophy. Mating is usually linked to SSK hypertrophy in snakes (Krohmer, 2004; Rojas et al., 2013). Mating in autumn has been observed for several *Bothrops* species (Almeida-Santos & Salomão, 2002), and the peak in the production of sexual granules in the SSK corroborates the hypothesis of autumnal mating for *B. cotiara*. Although we do not have male samples from spring to verify the SSK condition during this season, we infer that SSK plays a role in the formation of the mating plug in *B. cotiara*. The presence of a mating plug in a female in spring indicates that *B. cotiara* may reproduce in autumn as well as in spring, depending on how long the mating plug remains inside the vagina. In *Thamnophis sirtalis*, the mating plug only lasts for 2-3 days and, while dissolving, releases spermatozoa, thereby serving as a spermatophore and as a chastity belt to reduce the probability of fertilization by other males (Friesen et al., 2013, Shine et al., 2000). No sperm was found, however, in the copulatory plug of *B. cotiara*. Shine et al. (2000) proposed that the formation of mating plugs in *T. sirtalis* may be linked to the brief duration of copulation (on average, 17 minutes, King et al., 2009). For bothropoids, copulation usually lasts between 3 to 5 hours (Silva et al., 2013), but the precise copulation duration of *B. cotiara* is as yet unknown. Species of the genus *Bothrops* may show both passive and active mate guarding tactics. Male-male combat, a form of

active mate guarding, occurs in the species of the *B. atrox* group (Almeida-Santos & Salomão, 2002), whereas mating plugs may be a form of passive mate guarding. Bosch (1994) reported, for the first time, mating plugs for lizards, which neither appeared to act as a chastity belt nor to decrease female attractiveness and receptivity (Moreira & Birkhead, 2003) or assure higher rates of fertilization for first males; instead its function was related to the prevention of sperm leakage (Moreira et al., 2007).

Future studies should address the formation, functions and longevity of mating plugs in *Bothrops* species. Histochemical analysis of both mating plugs and SSK secretions may confirm the role of the kidneys in producing mating plug substances and provide information on the composition of plugs (e.g., proteins and carbohydrates). Experiments in captivity (cf. Moreira & Birkhead, 2003, 2004, Moreira et al., 2006, 2007) and collection of data about the presence of mating plugs in a larger number of individuals and bothropoid species in the wild may provide new insights about mating plugs in *Bothrops*. Finally, studies with larger samples of *B. cotiara* are needed to investigate the role of the reproductive aspects described herein in the context of the female and male reproductive cycles.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Glaucia M. F. Pontes and Gustavo Graciolli for allowing access to the collections; Diva D. S. Morena for allowing the use of equipment, Liliana Piatti, Thomaz R. F. Sinani and Karina M. P. da Silva for the technical assistance; FAPESP for financial support to Verônica A. Barros (2012/15037-4).

REFERENCES

- Aldridge, R.D., Jellen, B.C., Siegel, D.S. & Wisniewski, S.S. (2011). The sexual segment of the kidney. In *Reproductive biology and phylogeny of snakes*, 477-509. Aldridge, R.D. & Sever, D.M. (eds). Connecticut: Science Publishers.
- Almeida-Santos, S.M. & Salomão, M.G. (2002). Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In *Biology of the vipers*, 445-462. Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E & Greene, H.W. (eds). California: Eagle Mountain Publishing.
- Almeida-Santos, S.M., Laporta-Ferreira, I.L., Antoniazzi, M.M. & Jared, C. (2004). Sperm storage in males of the snake *Crotalus durissus terrificus* (Crotalinae: Viperidae) in southeastern Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology* 139, 169-174.
- Almeida-Santos, S.M., Pizzatto, L., & Marques, O.A.V. (2006). Intra-sex synchrony and inter-sex coordination in the reproductive timing of the Atlantic coral snake *Micrurus corallinus* (Elapidae) in Brazil. *Herpetological Journal* 16, 371-376.
- Althaus, S., Jacob, A., Graber, W., Hofer, D., Nentwig, W. & Kropf, C. (2010). A double role of sperm in Scorpions: the mating plug of *Euscorpius italicus* (Scorpiones: Euscorpiidae) consists of sperm. *Journal of Morphology* 271, 383-393.
- Barros, V.A., Rojas, C.A., & Almeida-Santos, S.M. (2014). Is rainfall seasonality important for reproductive strategies in viviparous Neotropical pit vipers? A case study with *Bothrops leucurus* from the Brazilian Atlantic Forest. *Herpetological Journal* 24, 41-49.
- Bauer, R.T. & Min, L.J. (1993). Spermatophores and plug substance of the marine shrimp *Trachypenaeus similis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae): formation in the male

reproductive tract and disposition in the inseminated female. *The Biological Bulletin* 185, 174-185.

Bian, X., Gandahi, J.A., Liu, Y., Yang, P., Liu, Y., Zhang, L., Zhang, Q. & Chen, Q. (2013). The ultrastructural characteristics of the spermatozoa stored in the cauda epididymidis in Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis* during the breeding season. *Micron* 44, 202-209.

Bishop, J. E. (1959). A histological and histochemical study of the kidney tubule of the common garter snake, *Thamnophis sirtalis*, with special reference to the sexual segment in the male. *Journal of Morphology* 104, 307-357.

Bosch, H.A.J. (1994). First record of mating plugs in lizards. *Amphibia-Reptilia* 15, 89-93.

Bressan, P.M., Kierulff, M.C.M. & Sugieda, A.M. (2009). *Fauna ameaçada de extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados*. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

Campbell, J.A. & Lamar, W.W. (2004). *The venomous reptiles of the western hemisphere*. Ithaca: Cornell University Press.

Carrasco, P.A., Mattoni, C.I., Leynaud, G.C. & Scrocchi, G.J. (2012). Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologica Scripta* 41, 109-124.

Crews, D. & Garstka, W.R. (1982). The ecological physiology of a garter snake. *Scientific American* 1982, 159-165.

Cutter, A.D. (2008). Reproductive Evolution: Symptom of a Selfing Syndrome. *Current Biology* 18, 1056-1058.

Dufaure, J., & Saint-Girons, H. (1984). Histologie compare de l'épididyme et de ses secretions chez les reptiles (lézards et serpents). *Archives d'anatomie microscopique et de morphologie expérimentale* 73, 15-26.

- Fox, W. (1952). Seasonal variation in the male reproductive system of Pacific coast garter snakes. *Journal of Morphology* 90, 481-553.
- Fox, W. (1956). Seminal receptacles of snakes. *Anatomical Records* 124: 519-539.
- Fox, W. (1977). The urogenital system of reptiles. In *Biology of the Reptilia*, 1-157. Gans, C. & Parsons, T.S. (eds). New York: Academic Press.
- Friesen, C.R., Shine, R., Krohmer, R.W. & Mason, R.T. (2013). Not just a chastity belt: the functional significance of mating plugs in garter snakes, revisited. *Biological Journal of the Linnean Society* 109, 893-907.
- Gang, L., Qiao-Qiao, L., Hu-Hu, Y. & Qiong-Xia, W. (2011). Histological and immunocytochemical study of deferens ducts in the Chinese rat snake (*Zaocys dhumnades*). *Zoological Research* 32, 663-669.
- Gist, D.H., Dawes, S.W., Turner, T.W., Sheldon, S. & Congdon, J.D. (2002). Sperm storage in turtles: a male perspective. *Journal of Experimental Zoology* 292, 180-186.
- King, R.B., Jadin, R.C., Grue, M. & Walley, H.D. (2009). Behavioural correlates with hemipenis morphology in New World natricine snakes. *Biological Journal of the Linnean Society* 98, 110-120.
- Krohmer, R.W. (2004). Variation in seasonal ultrastructure of sexual granules in the renal sexual segment of the Northern Water Snake, *Nerodia sipedon sipedon*. *Journal of Morphology* 261, 70-80.
- Martins, M., Marques, O.A.V. & SAZIMA, I. (2002). Ecological and Phylogenetics Correlates of Feeding Habits in Neotropical Pitvipers of the Genus *Bothrops*. In *Biology of the vipers*, 307-328. Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E & Greene, H.W. (eds). California: Eagle Mountain Publishing.

- Mikich, S.B. & Bérnils, R.S. (2004). *Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná*. Brasil: Estado do Paraná. Retrieved from <http://www.pr.gov.br/iap>.
- Moreira, P.L. & Birkhead, T.R. (2003). Copulatory plugs in the Iberian rock lizard do not prevent insemination by rival males. *Functional Ecology* 17, 796-802.
- Moreira, P.L. & Birkhead, T.R. (2004). Copulatory plug displacement and prolonged copulation in the Iberian rock lizard (*Lacerta monticola*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 56, 290-297.
- Moreira, P.L., López, P. & Martín, J. (2006). Femoral secretions and copulatory plugs convey chemical information about male identity and dominance status in Iberian rock lizards (*Lacerta monticola*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60, 166-174.
- Moreira, P.L., Nunes, V.L., Martín, J. & Paulo, O.S. (2007). Copulatory plugs do not assure high first male fertilisation success: sperm displacement in a lizard. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62, 281-288.
- Parga, J.A., Maga, M., & Overdorff, D.J. (2006). High resolution X-ray computed tomography scanning of primate copulatory plugs. *American Journal of Physical Anthropology* 129, 567-576.
- Rojas, C.A., Barros, V.A. & Almeida-Santos, S.M. (2013). The reproductive cycle of the male sleep-snake *Sibynomorphus mikanii* (Schlegel, 1837) from southeastern Brazil. *Journal of Morphology* 274, 215-228.
- Rojas, C.A., Barros, V.A. & Almeida-Santos, S.M. (2015). Sperm storage and morphofunctional bases of the female reproductive tract of the snake *Philodryas patagoniensis* from Southeastern Brazil. *Zoomorphology* 134: 577-586.
- Saint Girons, H., & Pfeffer, P. (1971). Le cycle sexuel des serpentes du Cambodge. *Annales des Sciences Naturelles Comprenant la Zoologie* 12/13, 543-572.

São Paulo. (2008). Decreto Estadual nº 53.494, de 2 de outubro de 2008. Declara as espécies da fauna silvestre ameaçadas, as quase ameaçadas, as colapsadas, sobrexplotadas, ameaçadas de sobrexplotação e com dados insuficientes para avaliação no Estado de São Paulo e dá providências correlatas. *Diário Oficial do Estado de São Paulo* 1, 118-187.

Schuett, G.W. (1992). Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers? In *Biology of the pitvipers*, 169-184. Campbell, J.A. & Brodie Jr, E.D. (eds). Texas: Selva.

Sever, D. M. (2010). Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). IV. The proximal testicular ducts. *Journal of Morphology* 271, 104-115.

Sever, D.M. & Freeborn, L.R. (2012). Observations on the anterior testicular ducts in snakes with emphasis on sea snakes and ultrastructure in the yellow-bellied sea snake, *Pelamis platurus*. *Journal of Morphology* 273, 324-336.

Shine, R., Olsson, M.M. & Mason, R.T. (2000). Chastity belts in gartersnakes: the functional significance of mating plugs. *Biological Journal of the Linnean Society* 70, 377-390.

Silva, K.M.P., Sueiro, L.R., Galassi, G.G. & Almeida-Santos, S.M. (2013). Reprodução de *Bothrops* spp. (Serpentes, Viperidae) em criadouro conservacionista. *Veterinária e Zootecnia* 20, 632-642.

Spector, D. L. & Goldman, R.D. (2006). *Basic Methods in Microscopy. Protocols and Concepts from Cells: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Stuart-Smith, J., Swain, R. & Welling, A. (2005). Reproductive ecology of the mountain dragon, *Rankinia (Tymanocryptis) diemensis* (Reptilia: Squamata: Agamidae) in Tasmania. *Papers and Proceedings of the Royal Society of Tasmania* 139, 23-28.

Trauth, S.E., & Sever, D.M. (2011). Male urogenital ducts and cloacal anatomy. In *Reproductive biology and phylogeny of snakes*, 411-475. Aldridge, R.D. & Sever, D.M. (eds). Connecticut: Science Publishers.

Tumkiratiwong, P., Meesuk, W., Chanhom, L. & Aowphol, A. (2012). Reproductive patterns of captive male and female monocled cobra *Naja kaouthia* (Lesson, 1831). *Zoological Studies* 51, 692-700.

Uhl, G., Nessler, S.H., Schneider, J.M. (2010). Securing paternity in spiders? A review on occurrence and effects of mating plugs and male genital mutilation. *Genetica* 138, 75-104.

Volsøe, H. (1944). Structure and seasonal variation of the male reproductive organs of *Vipera berus* (L.). *Spolia Zool Mus Hauniensis* 5, 1-157.

Wüster, W., Salomão, M.G., Quijada-Mascareñas, J.A. & Thorpe, R.S. (2002). Origin and evolution of the South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In *Biology of the vipers*, 111-129. Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E & Greene, H.W. (eds). California: Eagle Mountain Publishing.

Appendix 1. Voucher number and procedence of *Bothrops cotiara* specimens examined.

Males: MCT 17299, Cruz Machado, Paraná (26°01'03"S and 51°20'48"W); MCT 17339, União da Vitória, Paraná (26°13'48"S and 51°05'11"W); MCT 17304, Palmas, Paraná (26°29'03"S and 51°59'26"W); UFMS 1644, Curitiba, Paraná (25°25'40"S and 49°16'23"W).

Females: MCT 17335, União da Vitória, Paraná (26°13'48"S and 51°05'11"W); MCT 17497, Lebon Regis, Santa Catarina (26°55'44"S and 50°41'43"W); MCT 17498, Lebon Regis, Santa Catarina (26°55'44"S and 50°41'43"W).

Capítulo 5

Biologia reprodutiva de *Bothrops alternatus* do sul do Brasil

Manuscrito para o periódico Zoological Science

Resumo

Bothrops alternatus é uma espécie basal no gênero *Bothrops* que apresenta ampla distribuição. O objetivo deste estudo é contribuir com novos dados para o conhecimento da biologia reprodutiva desta espécie, anteriormente estudada por outros autores. A vitelogênese secundária ocorre durante um longo período no ano. Relatos anteriores mostram que a estocagem de espermatozoides ocorre nesta espécie, sincronizando a cópula no outono/inverno com a ovulação na primavera. Fêmeas reprodutivas (vitelogênicas e com prenhez recente) apresentaram plug copulatório na vagina em todas as estações do ano, o que mostra a necessidade de futuras investigações mais detalhadas sobre as funções e o tempo de permanência do plug copulatório na vagina, que aparentemente indica uma plasticidade em relação à época de cópula para esta espécie, que poderia ocorrer também na primavera. Os machos amostrados dentro de uma única estação apresentam variabilidade em relação ao estágio reprodutivo, mas de forma geral a atividade testicular ocorre entre o verão e outono, prolongando-se até o inverno. Na primavera foi observada a regressão total do epitélio seminífero nos testículos. O segmento sexual renal apresenta hipertrofia em sincronia com a atividade testicular, durante as estações mais quentes do ano, primavera e verão. Como a hipertrofia do segmento sexual renal está associada com a época de acasalamento, este pode ser considerado mais um indicativo de que novas observações sobre o comportamento reprodutivo desta espécie são necessárias, sobretudo na primavera.

Palavras-chave: serpentes, Viperidae, ciclos reprodutivos, plugs copulatórios, espermatogênese, segmento sexual renal, ducto deferente, reações histoquímicas

Introdução

As jararacas do gênero *Bothrops* são o grupo de serpentes venenosas com maior número de espécies na região neotropical (Campbell & Lamar, 2004, Carrasco et al, 2012). Alguns grupos monofiléticos de espécies podem ser reconhecidos nesta linhagem de serpentes (Salomão et al., 1999, Fenwick et al., 2009). *Bothrops alternatus*, *B. cotiara* e *B. itapetiningae* fazem parte da linhagem mais basal do gênero *Bothrops*, o grupo *B. alternatus* (Salomão et al., 1999, Fenwick et al., 2009). O estudo de espécies basais é fundamental para uma interpretação correta acerca da evolução de padrões conservativos ou derivados em linhagens filogenéticas. Isto se aplica a todos os aspectos da biologia das espécies, incluindo a reprodução. *Bothrops alternatus* é a espécie mais comum e abundante desta linhagem e, portanto, um bom modelo para estudo da biologia neste gênero. *Bothrops alternatus* é uma serpente terrestre, especialista em dieta (presas restringem-se a roedores e marsupiais) (Martins et al, 2002, Nunes et al, 2010), que ocorre no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (Martins et al., 2002). Estudos sobre aspectos reprodutivos de *B. alternatus* já foram realizados para populações no Brasil (Nunes et al., 2010, Amaral, 2015) e Argentina (Giraud et al., 2008), porém a biologia reprodutiva desta espécie ainda está longe de ser bem conhecida.

A estocagem de esperma é um componente do ciclo reprodutivo de *B. alternatus* (Almeida-Santos e Salomão, 2002, Nunes et al., 2010, Amaral, 2015). Foi encontrado esperma estocado em duas porções diferentes do oviduto, nos sulcos da junção útero-vaginal (JUV) e nos receptáculos de estocagem de esperma no infundíbulo posterior (Nunes et al., 2010, Amaral, 2015). A estocagem de esperma permite que a época de cópula seja dissociada da época em que ocorre a ovulação, prenhez e o nascimento dos

filhotes (Schuett, 1992, Almeida-Santos & Salomão, 2002). Embriões nos ovidutos de *B. alternatus* foram observados entre a primavera e o verão (setembro a janeiro) (Nunes et al., 2010, Amaral, 2015). Assim como para muitas outras espécies de animais, o nascimento dos filhotes de *B. alternatus* parece ocorrer em um período restrito do ano, durante as estações mais quentes e chuvosas, como o verão. Nesta época, os filhotes têm mais chances de sobreviver em função da maior disponibilidade de presas e pelas altas temperaturas que influenciam a biologia das serpentes que são animais ectotérmicos.

Recentes estudos (Nunes et al., 2010, Amaral, 2015) caracterizaram os ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de *B. alternatus*, incluindo a descrição da estocagem de espermatozoides no oviduto das fêmeas.

O objetivo deste estudo é abordar novos aspectos dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas de uma população de *B. alternatus* do Estado do Rio Grande do Sul no Brasil. Este é o primeiro estudo a incluir uma análise microscópica de todas as partes do oviduto (vagina, junção útero-vaginal, útero, infundíbulo posterior e anterior (cf. Capítulo 1 desta tese, Rojas et. al, 2015) desta espécie, o que acarretou na descoberta da existência do plug copulatório na vagina de fêmeas de *B. alternatus*. Recentemente, foi relatada a descoberta de plugs gelatinosos (ou plugs copulatórios) em fêmeas de diferentes espécies do gênero *Bothrops* (Kasperoviczus e Almeida-Santos, 2012, Capítulos 1, 4 e 7 desta tese), incluindo *B. cotiara* (Capítulo 4), que é filogeneticamente próxima de *B. alternatus*. Algumas funções já foram propostas para estes plugs copulatórios em outras espécies de serpentes e lagartos, incluindo a prevenção da perda de espermatozoides por vazamento (tampão copulatório) e a guarda sexual das fêmeas (que se tornariam menos atraentes para outros machos na presença do plug, funcionando, neste caso, como cinto de castidade) (Shine et al., 2000, Moreira & Birkhead, 2004). O plug copulatório da

serpente *Thamnophis sirtalis* funciona como um espermatóforo (Friesen et al., 2013). O plug copulatório é formado pelas secreções do segmento sexual renal (SSR), uma estrutura sexual secundária cuja hipertrofia é dependente dos níveis de testosterona (Fox, 1977, Aldridge et al., 2011). Isto reforça a importância de observar as sincronias entre os eventos dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas para compreender a biologia reprodutiva das espécies de serpentes (Almeida-Santos et al., 2014). Por esta razão, este estudo procurou amostrar indivíduos de ambos os sexos e incluiu análises histoquímicas para investigar a existência de proteínas e carboidratos na composição dos plugs gelatinosos encontrados na vagina das fêmeas e também no SSR dos machos. Uma vez que os plugs provavelmente são formados a partir das secreções do SSR, espera-se que as composições dos plugs e das secreções do SSR sejam semelhantes.

Além da caracterização do SSR, uma análise adequada do ciclo reprodutivo dos machos de serpentes deve incluir análises histológicas dos testículos e ductos deferentes (Mathies, 2011, Rojas et al., 2013, Almeida-Santos et al., 2014). Para *B. alternatus*, uma avaliação histológica de todos estes órgãos está disponível em Amaral (2015), cujos dados apontam em geral para um pico de atividade testicular durante o verão e outono e do SSR durante o outono e inverno. Uma análise anterior baseada em indicadores macroscópicos como o volume dos testículos já apontava para o verão e outono como as estações em que provavelmente ocorreria a produção de esperma (Nunes et al., 2010).

Neste estudo apresentamos dados inéditos sobre a biologia reprodutiva de uma população da região sul do Brasil. Para compor o ciclo reprodutivo de machos e fêmeas desta população do Rio Grande do Sul, foram consideradas as análises macroscópicas e microscópicas do trato reprodutivo, em conjunto com dados disponíveis para esta espécie na literatura.

Material e Métodos

Foram examinados um total de 72 espécimes de *Bothrops alternatus* (28 fêmeas sexualmente maduras, 35 machos sexualmente maduros e 09 imaturos), provenientes do Estado do Rio Grande do Sul na região sul do Brasil. Os indivíduos estão depositados no Museu de Ciência e Tecnologia (MCT) da Pontifícia Universidade Católica (PUC) do Rio Grande do Sul.

O comprimento rostro-cloacal de todas as serpentes foi registrado, e após a dissecação ventral para exame da anatomia interna dos animais, os seguintes dados foram tomados para as fêmeas: diâmetro do maior folículo ovariano ou presença de embriões nos oviduto das fêmeas; presença/ausência de contorção muscular uterina na junção útero-vaginal (*uterine muscular twisting* - UMT) (cf. Almeida-Santos and Salomão, 1997; 2002; Barros et al., 2012, 2014); e presença de corpo lúteo nos ovários. Para os machos foram registrados o comprimento do testículo direito e a largura do ducto deferente na região distal próxima à cloaca.

O ducto deferente foi considerado convoluto ou não convoluto de acordo com seu aspecto macroscópico (cf. Almeida-Santos et al, 2006). A confirmação da presença de espermatozóides por meio de análises histológicas dos testículos e ductos deferentes foi o principal critério para determinação da maturidade sexual nos machos. O aspecto convoluto dos ductos deferentes foi utilizado como um critério adicional. As fêmeas foram consideradas maduras na presença de folículos em vitelogênese secundária nos ovários, embriões nos oviduto, ou ainda na presença de corpo lúteo (ou suas marcas) nos ovários indicando a existência de ovulação prévia. As fêmeas que não apresentaram nenhuma destas características foram consideradas imaturas.

O ciclo reprodutivo das fêmeas foi determinado pela variação do tamanho dos maiores folículos ovarianos e pela presença de embriões no oviduto nos diferentes meses do ano. Todas as partes do oviduto das fêmeas (infundíbulo anterior e posterior, útero, junção útero-vaginal (JUV) e vagina) foram coletadas para análises microscópicas deste órgão (Rojas et al., 2015). Após a confecção das lâminas, além da caracterização da morfologia de cada região do oviduto, foi realizada a procura por espermatozoides em todas as regiões deste órgão. Para as vaginas com plug gelatinoso foram realizados testes histoquímicos com azul de bromofenol, para identificação de proteínas; Ácido Periódico de Schiff (PAS) para identificação de carboidratos neutros; e Alcian Blue (AB) para glicosaminoglicanos carboxilados. Para fins de comparação, estas reações histoquímicas também foram realizadas no segmento sexual dos machos. Para compor o ciclo reprodutivo dos machos, além destas análises foram consideradas as mudanças sazonais no testículo, ducto deferente e segmento sexual renal. A correlação entre o comprimento do testículo e o comprimento do corpo foi testada por regressão linear. Uma análise de covariância (ANCOVA) foi empregada para comparar o comprimento do testículo entre as diferentes estações, utilizando o CRC como co-variável. Diferenças sazonais em relação à largura da porção distal do ducto deferente entre as estações foram testadas por análise de variância (ANOVA). Após a disseção e tomada de medidas macroscópicas nos machos, o testículo direito, a porção distal do ducto deferente e a porção anterior do rim foram coletadas para análises histológicas e também histoquímicas, no caso dos rins.

Os órgãos coletados para histologia foram preservados em álcool 70 % e processados para microscopia de luz pelo método de parafina. Cortes de 5 µm foram corados com hematoxilina e eosina (H/E). O ciclo espermatogênico foi analisado em função dos tipos de células da linhagem espermatogênica presentes nos túbulos seminíferos. Não foram

realizadas medidas microscópicas dos testículos, pois os túbulos seminíferos não apresentaram o formato circular necessário para uma coleta e análise de dados confiáveis. Para verificar a existência de um pico de hipertrofia do SSR nos rins foram tomadas as seguintes medidas dos túbulos do SSR: altura do epitélio e diâmetro dos túbulos. Na presença de variâncias desiguais para o conjunto destas duas variáveis, a variação destes parâmetros entre as estações foi verificada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com testes de Dunn para análise das diferenças sazonais. A conformação do epitélio do ducto deferente foi analisada quanto à presença ou ausência de ampulla ductus deferentis.

Resultados

Fêmeas

Folículos em vitelogênese primária foram encontrados em fêmeas ao longo do ano todo e folículos em vitelogênese secundária também ocorreram durante um período estendido (Fig. 1). Embriões em estágio inicial (somente vitelo visível a olho nú) nos ovidutos foram observados em Novembro, Dezembro e Março entre o final da primavera e o verão (Fig. 1). A presença de UMT na JUV foi observada em fêmeas coletadas em todas as estações do ano na presença de folículos em vitelogênese secundária e também primária (Fig. 1). Não foram encontrados espermatozoides estocados na UMT de nenhuma fêmea, e tampouco em qualquer outra parte do oviduto. Ao coletar amostras da vagina para análise histológica, foi observada a presença de plugs copulatórios nesta porção terminal do oviduto em algumas fêmeas (Tabela 1). Nestas fêmeas que estavam preservadas em álcool na coleção, os plugs apresentavam uma

textura gelatinosa e uma coloração amarelada. Não foi observada a presença de esperma em nenhum dos plugs copulatórios encontrados. Os testes histoquímicos do plug gelatinoso apresentaram resultados positivos para carboidratos (PAS) e glicosaminoglicanos carboxilados (AB), e reações negativas para o azul de bromofenol (proteínas).

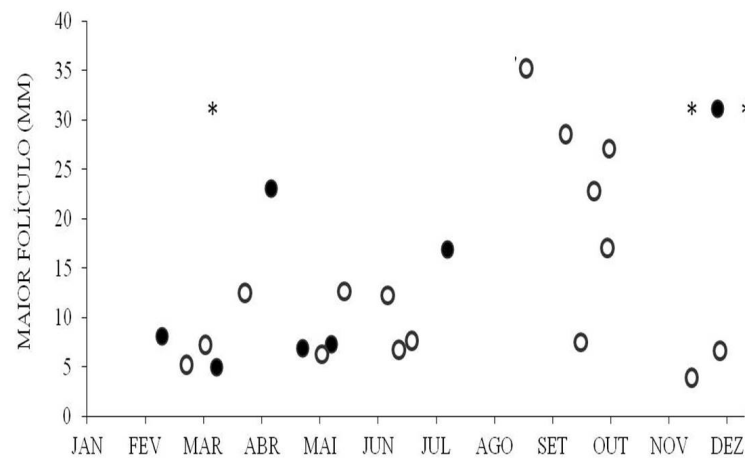


Fig. 1: Ciclo reprodutivo das fêmeas de *Bothrops alternatus* do Rio Grande do Sul no Brasil. Círculos pretos representam os maiores folículos ovarianos de fêmeas que apresentavam UMT na JUV. Os círculos brancos representam os maiores folículos de fêmeas sem a presença de UMT. Os asteriscos representam fêmeas com embriões em estágio inicial nos ovidutos.

Tabela 1: Fêmeas de *Bothrops alternatus* com presença de plug copulatório na vagina

Indivíduo	CRC (cm)	Estação	Procedência	Status reprodutivo	UMT na JUV?
MCT 6020	142	06/03/1994 verão	Cachoeira do Sul, RS	Vitelogênica	Não
MCT 1328	136	08/05/2002 outono	Cachoeira do Sul, RS	Vitelogênica	Não
MCT 10843	120	08/09/1998 inverno	Cachoeira do Sul, RS	Vitelogênica	Não
MCT 10935	89	15/10/1998 primavera	São Francisco de Paula, RS	Prenhez *	Sim
MCT 9269	137	14/11/1997 primavera	Viamao, RS	Prenhez *	Não
MCT 10842	117	15/12/1997 primavera	Cachoeira do Sul, RS	Vitelogênica	Sim

* Fêmeas prenhes com embriões em estágio inicial de desenvolvimento, somente vitelo visível a olho nú

Machos

Apesar de não ter havido variação do comprimento do testículo entre as estações (ANCOVA, $F = 1,7566$, $p = 0,1814$) (Fig.2A), a análise histológica dos testículos mostra que o ciclo espermatogênico é sazonal (Fig. 3). Há variabilidade em relação ao estágio do epitélio seminífero dos testículos dentre os indivíduos coletados em uma mesma estação. A espermatogênese começa no verão e o pico é atingido entre o final do verão (Março) e o outono. A espermiogênese foi observada no final do verão, ao longo do outono, e no início do inverno (Julho). Ainda no verão, teve início para alguns indivíduos, o processo de regressão do epitélio testicular, que também foi observado na estação seguinte (outono).

A regressão total do epitélio seminífero (com presença de apenas uma ou duas camadas de espermatogônias) foi observada somente na primavera (Fig. 3).

A hipertrofia do segmento sexual renal foi observada em todas as estações do ano (Fig. 4), porém não em todos os indivíduos amostrados. A análise da variação da altura do epitélio e do diâmetro dos túbulos do SSK mostrou um aumento significativo durante as estações mais quentes (primavera e verão) em relação às estações mais frias (outono e inverno), quando foi observado um decréscimo destes valores (Altura do epitélio do SSK: $H = 14,85$; $p = 0,0019$; com $p < 0,05$ para verão > inverno, primavera > outono e inverno; Diâmetro dos túbulos do SSK: $H = 48,27$; $p < 0,0001$; com $p < 0,05$ para verão > outono e inverno, primavera > outono e inverno). A análise histoquímica dos rins mostrou resultados positivos no SSR para proteínas (azul de bromofenol) e carboidratos (PAS). Para o corante Alcian Blue, a reação foi negativa na região do SSR.

A largura da região distal do ducto deferente, utilizada como indicador para estocagem de esperma (Almeida-Santos et. al., 2006) não apresentou diferença entre as estações (ANOVA, $F = 1,0531$; $p = 0,3845$) (Fig. 2B). Esperma foi observado no ducto deferente ao longo do ano todo e alguns machos (porém não todos) mostraram a presença de dobras e sulcos profundos no epitélio da região distal do ducto deferente, ou seja, apresentaram a conformação microscópica da ampulla ductus deferentis.

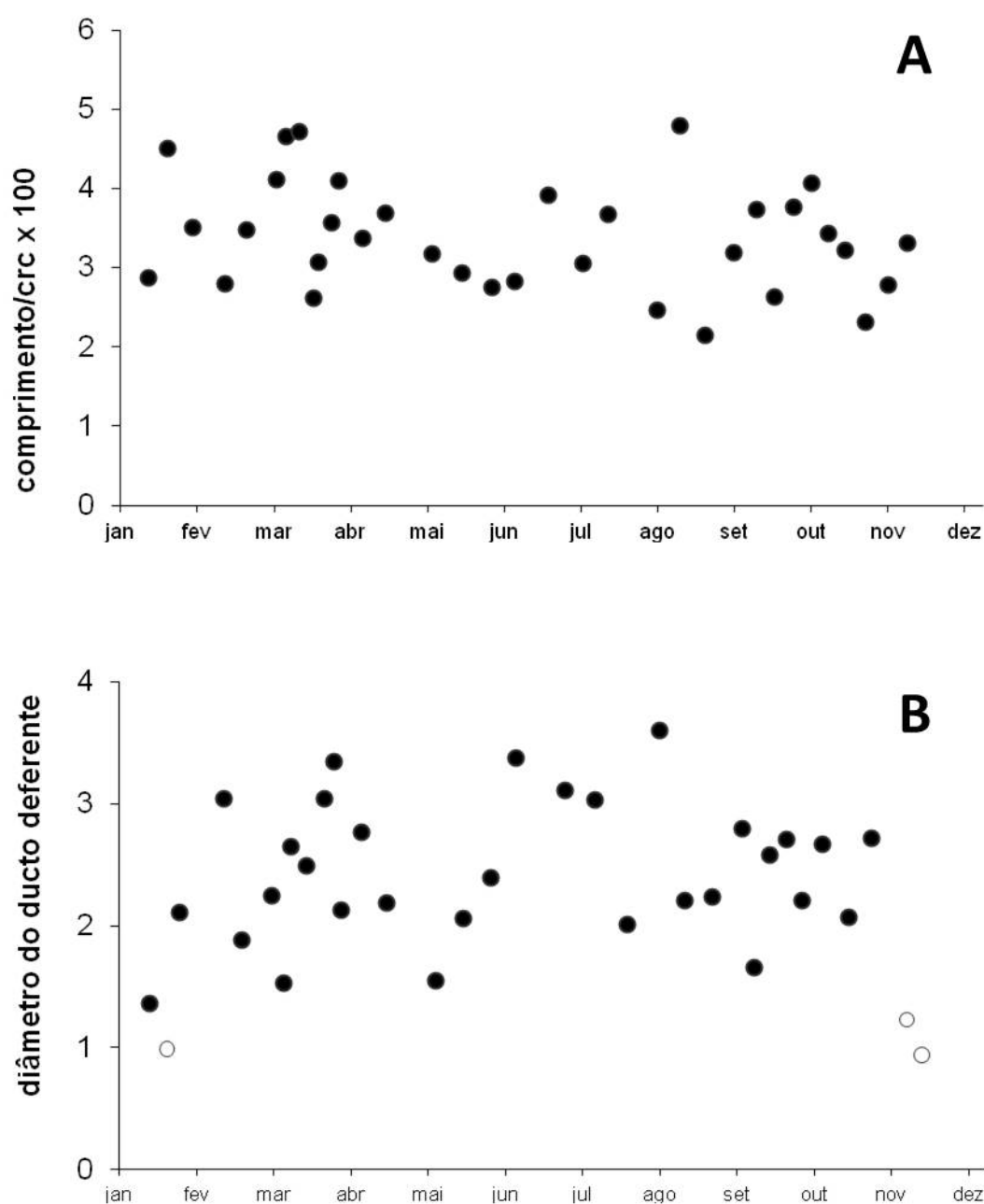


Fig 2: A. Variação sazonal do comprimento relativo do testículo em *Bothrops alternatus* do Rio Grande do Sul. **B.** Variação sazonal do diâmetro do ducto deferente em *Bothrops alternatus* do Rio Grande do Sul. Os círculos pretos representam ductos deferentes que estão enovelados e os círculos brancos representam ductos que não estão enovelados

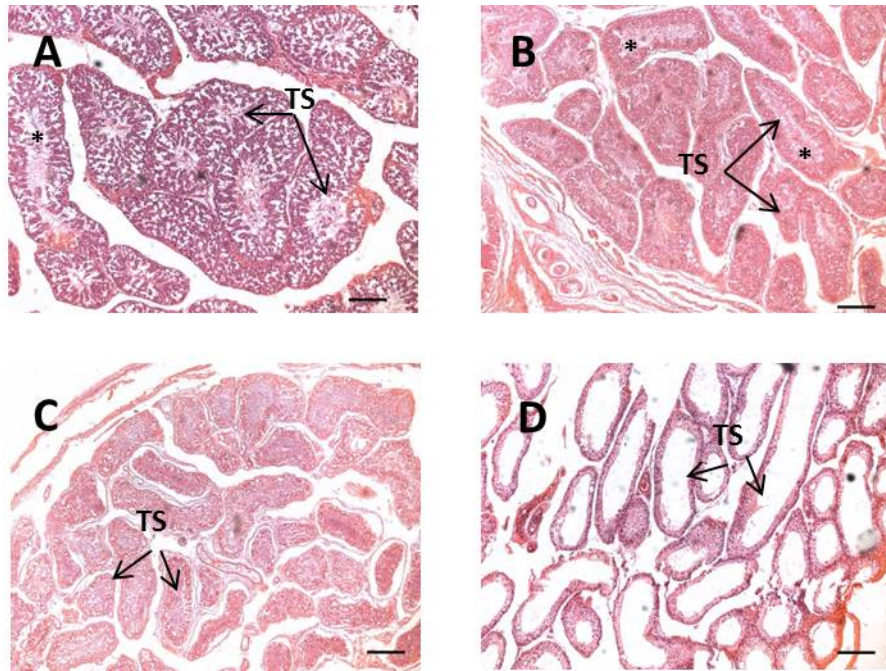


Fig. 3 : Ciclo testicular de *Bothrops alternatus* do Rio Grande do Sul no Brasil A. Verão B. Outono C. Inverno D. Primavera. TS: túbulos seminíferos, *: espermatozóides.

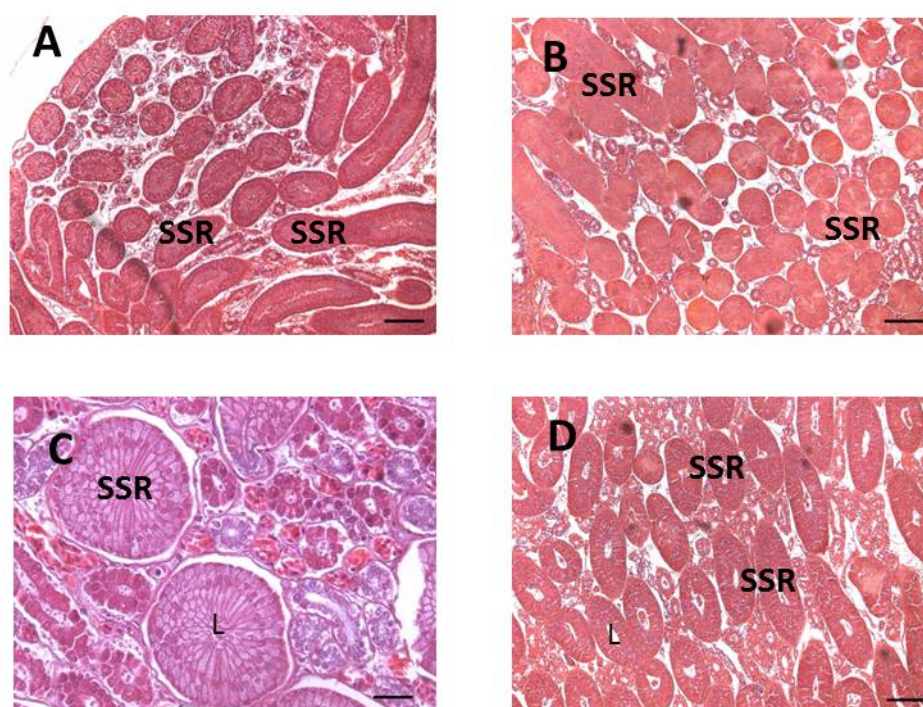


Fig. 4: Ciclo do segmento sexual renal de *Bothrops alternatus* do Rio Grande do Sul no Brasil. A. Verão B. Outono. C. Inverno D. Primavera. SSR: segmento sexual renal, L: lúmen.

Discussão

A principal descoberta deste estudo é a ocorrência dos plugs copulatórios na vagina das fêmeas de *B. alternatus*. Estes plugs foram encontrados em diferentes estações, o que nos permite elaborar algumas hipóteses sobre a sazonalidade dos eventos reprodutivos em *B. alternatus*. Para tanto, primeiramente precisamos analisar em conjunto os estudos anteriores sobre a reprodução desta espécie. Os estudos de diferentes populações de *B. alternatus* apontam para um padrão comum de ocorrência dos eventos reprodutivos para esta espécie, com um período prolongado de vitelogênese secundária, iniciando no outono (Abril/Maio), podendo se estender pelo inverno e primavera, até o verão.

(Giraud et al., 2008, Nunes et al., 2010, Amaral, 2015, este estudo). A vitelogênese estendida não é um indicador de sazonalidade dos ciclos reprodutivos e é comum no gênero *Bothrops*, uma vez que já foi observada em outras espécies deste gênero (Capítulo 7 desta tese). Diferentes fatores podem influenciar a taxa de deposição de vitelo nos folículos, como a condição corpórea (Reading et al., 2004) e os níveis hormonais das fêmeas (Cree et al., 1991). Os embriões no oviduto só são observados a partir da primavera (Giraud et al., 2008, Nunes et al., 2010, Amaral, 2015, este estudo), o que indica que a ovulação ocorra nesta estação, de forma semelhante ao ciclo reprodutivo de outras serpentes do gênero *Bothrops* (Almeida-Santos & Salomão, 2002, Capítulo 7 desta tese).

A cópula foi observada somente em cativeiro durante o outono (Maio) (Giraud et al., 2008) e inverno (Julho) (Giraud et al., 2008, Nunes et al., 2010). Desta forma, como os períodos de cópula (outono/inverno) e ovulação (primavera) (conhecidos para esta espécie até mesmo momento) ocorrem em estações diferentes, presume-se que as fêmeas apresentem estocagem de esperma no oviduto para sincronizar o ciclo reprodutivo (Schuett, 1992, Almeida-Santos & Salomão, 2002). Há relatos da presença de esperma estocado em diferentes porções do oviduto de fêmeas de *B. alternatus* do sul do Brasil (Nunes et al., 2010, Amaral, 2015). Nunes et al. (2010) observou a presença de espermatozoides estocados na UMT, porém não é possível fazer outras inferências com base neste registro pois a estação de coleta do animal não está disponível. Já Amaral (2015) descreve a presença de esperma estocado tanto pela UMT na JUV, quanto nos receptáculos de esperma do infundíbulo. A maior parte das fêmeas que apresentou esperma estocado na UMT foi coletada entre o outono e inverno, (Amaral, 2015), período compreendido entre a cópula e a ovulação. A maioria destas fêmeas não apresentava

esperma nos receptáculos do infundíbulo (Amaral, 2015), corroborando o papel da JUV como um sítio de estocagem de esperma e a função da UMT na manutenção dos espermatozoides nesta porção. Esta contração (UMT) seria relaxada na época da ovulação, quando os espermatozoides ascenderiam para o infundíbulo (Almeida-Santos & Salomão, 1997, 2002). Outras fêmeas de *B. alternatus* da região sul apresentaram esperma em ambos sítios de estocagem de esperma, JUV e infundíbulo durante o inverno (Amaral, 2015), minha interpretação é que isso pode indicar: (1) que a UMT não bloqueia totalmente a passagem do esperma para o útero e a consequente ascensão dos espermatozoides para o infundíbulo, e/ ou (2) que espermatozoides provenientes de diferentes estações de acasalamento possam permanecer estocados no infundíbulo por mais de uma estação reprodutiva. Espermatozoides foram observados no infundíbulo de uma fêmea de *B. alternatus* prenhe coletada durante a primavera (Amaral, 2015). Portanto, reforço que é provável a permanência dos espermatozoides nos receptáculos durante mais de uma estação já que a permanência do esperma nos receptáculos de esperma após a passagem dos ovócitos pelo infundíbulo no momento da ovulação e fertilização mostrou-se viável. Rojas et al. (2015) observaram a presença de esperma estocado na JUV de uma fêmea prenhe da serpente *Philodryas patagoniensis*, e consideraram a hipótese de que as fêmeas possam produzir várias ninhadas a partir de uma única cópula. Considerando um viperídeo, como *B. alternatus*, o tempo de estocagem deste esperma seria de pelo menos 2 anos, no caso dos ciclos bienais. Há relatos de estocagem de esperma de período superior a este (5 anos) para a serpente *Crotalus adamanteus* (Booth & Schuett, 2014).

Em *B. alternatus*, a prenhez ocorre entre a primavera (a partir de novembro) e o verão (até fevereiro) para as populações do sul do Brasil e Argentina (Giraud et al., 2008,

Nunes et al., 2010, Amaral, 2015, este estudo). Os nascimentos começam em fevereiro no verão e atingem um pico em março podendo se estender até o outono (abril e junho) (Giraud et al., 2008, Nunes et al., 2010). Nunes et al. (2010) relata ainda um nascimento em cativeiro no inverno, no mês de agosto, muito provavelmente fora da época normal em função das condições de cativeiro. Os filhotes geralmente nascem nos períodos mais quentes e com maior disponibilidade de alimento, quando suas chances de sobrevivência são maiores. A região sul do Brasil apresenta estações bem marcadas, com inverno frio, o que teoricamente seria desfavorável à sobrevivência dos filhotes de serpentes, que são animais ectotérmicos.

O plug copulatório foi encontrado apenas na vagina de fêmeas reprodutivas de *B. alternatus*: em duas fêmeas apresentando prenhez recente coletadas durante a primavera (apenas o vitelo estava visível macroscopicamente nestes embriões) ou em fêmeas vitelogênicas em todas as estações do ano, verão, outono, inverno e primavera. Como estes plugs gelatinosos são depositados pelos machos na vagina das fêmeas durante o momento da cópula, poderia ser feita uma associação entre a presença destes plugs e a época de cópula desde que o plug apresentasse um curto período de permanência na vagina das fêmeas de *B. alternatus*. A formação e função do plug gelatinoso vêm sendo bastante estudada na serpente *Thamnophis sirtalis*, uma serpente Natricinae da região temperada (Schwartz et al., 1989, Shine et al., 2000, Friesen et al., 2013). Para *T. sirtalis*, o plug gelatinoso dura pouco tempo na vagina das fêmeas, entre 2 a 3 dias (Friesen et al., 2013, Shine et al., 2000). Não se sabe ainda quanto tempo o plug pode permanecer na vagina das fêmeas de *Bothrops*, porém considerando que fêmeas em início de prenhez podem apresentar o plug parece razoável considerar que este possa durar mais do que 2 ou 3 dias. Se o plug copulatório de *B. alternatus* durar pouco tempo

no trato reprodutivo, a presença deste em fêmeas em todas as estações do ano pode indicar que o período de cópula apresente grande plasticidade nessa espécie, ocorrendo em outras estações além do outono, que é a estação onde se concentram os episódios de acasalamento no gênero *Bothrops* (Almeida-Santos & Salomão, 2002, Capítulo 7 desta tese). Novos estudos e observações de acasalamento e cópula em campo poderão colaborar para um melhor entendimento dessa questão e verificação desta hipótese. *Bothrops cotiara* também apresentou a presença do plug copulatório na primavera (Capítulo 4). Fêmeas de outras espécies de *Bothrops* do grupo *B. neuwiedi* também apresentaram o plug gelatinoso na vagina (Capítulo 1), além de fêmeas de outros grupos (Kasperoviczus e Almeida-Santos, 2012).

Várias funções já foram descritas ou propostas para o plug gelatinoso em outras espécies de serpentes e lagartos: (1) guarda copulatória passiva das fêmeas, ou seja, o plug funcionando como um cinto de castidade, tornando a fêmea menos atraente para os machos (Shine et al., 2000); (2) liberação gradual de esperma (espermatóforo) (Friesen et al., 2013); (3) impedir a perda de esperma por vazamento (“tampão”) (Moreira & Birkhead, 2003, Moreira et al., 2007). Em *Bothrops*, ainda não conhecemos as funções do plug gelatinoso. Neste estudo realizamos testes histoquímicos para conhecer a composição do plug e do SSR, uma vez que o plug copulatório é formado pelas secreções do SSR (Bishop, 1959, Fox, 1977, Aldridge et al., 2011). Os resultados obtidos revelaram que carboidratos estão presentes na composição do plug e dos grânulos do SSR. Por outro lado, o plug apresentou a presença de glicosaminoglicanos carboxilados (AB), não detectados na análise dos grânulos do SSR. Os testes de azul de bromofenol para a presença de proteínas também não foram coincidentes entre o plug e o SSR. A presença de proteínas foi identificada nas secreções do SSR, enquanto o material do plug

gelatinoso apresentou reação negativa. O plug da serpente *T. sirtalis* é formado principalmente por proteínas (Shine et al., 2000). É necessário continuar com a análise da composição do plug copulatório em *Bothrops*. Neste trabalho foi utilizado material de serpentes fixadas e mantidas em álcool em coleção, o que possivelmente pode interferir nos resultados. Seria interessante realizar novos testes para a detecção de proteínas utilizando material fresco do plug copulatório. Estes dados também podem indicar a presença de outras substâncias no plug, além das secreções do SSR, como esperma por exemplo. Dados sobre o tempo de permanência do plug no trato reprodutivo das fêmeas e a realização de experimentos para conduzir testes de hipóteses sobre suas funções podem ser os próximos passos para começarmos a entender como funciona esta tática reprodutiva nesta linhagem de serpentes.

Assim como para as fêmeas, o ciclo reprodutivo dos machos também apresenta evidências de que a cópula possa ocorrer em diferentes períodos do ano para alguns indivíduos da população. A hipertrofia do SSR indica a época do acasalamento em serpentes (Bishop, 1959, Aldridge et al., 2011). Neste estudo, esta hipertrofia foi medida pelo aumento do diâmetro dos túbulos e da altura do epitélio do SSR, com um pico evidente para a primavera e verão, estações mais quentes do ano, que não coincidem com os relatos de cópula (em cativeiro) para esta espécie no outono e inverno (Giraud et al., 2008, Nunes et al., 2010). Também foi observada a hipertrofia em indivíduos nestas estações, porém em um número menor de indivíduos. Por outro lado, a observação da hipertrofia do SSR nestas estações coincide com as observações da presença dos plugs gelatinosos encontrados na vagina das fêmeas. Estudos futuros devem investigar a possibilidade de acasalamento na primavera em *B. alternatus*.

Para uma população de viperídeo de clima frio - o clima pode ser considerado como temperado, subtemperado e subtropical no Rio Grande do Sul, veja Maluf (2000) - os machos de *B. alternatus* mostraram grande plasticidade em relação à época de produção dos espermatozóides, que foi observada até mesmo no inverno, quando ocorrem baixas temperaturas nessa região do Brasil. *B. alternatus* é uma das espécies de serpentes mais abundantes em comunidades de serpentes do sul do Brasil, o que provavelmente está relacionado com o alto sucesso reprodutivo desta espécie que apresenta táticas reprodutivas como a estocagem de esperma e o plug copulatório que precisam ser melhor investigadas.

Referências

- Aldridge RD, Jellen BC, Siegel DS, Wisniewski SS (2011) The sexual segment of the kidney. In “Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes” Ed by RD Aldridge, DM Sever, Science Publishers, Enfield, pp. 477-509
- Almeida-Santos SM, Braz HB, Santos LC, Sueiro LR, Barros VA, Rojas, CA, Kasperoviczus, KN (2014) Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados. *Herpetol Bras* 3: 14-24
- Almeida-Santos SM, Salomão MG (1997) Long-term sperm storage in the Neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalidae). *Jap J Herpetol* 17: 46-52
- Almeida-Santos SM, Salomão MG (2002) Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In “Biology of the vipers” Ed by G Schuett, M Höggren, ME Douglas, HW Greene, Eagle Mountain, Carmel, pp. 445-462

- Almeida-Santos SM, Pizzatto L, Marques OAV (2006) Intra-sex synchrony and inter-sex coordination in the reproductive timing of the Atlantic coral snake *Micrurus corallinus* (Elapidae) in Brazil. *Herpetol J* 16: 371-376
- Amaral FM (2015) Estratégias reprodutivas da serpente *Bothrops alternatus*: influência de fatores ambientais. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Barros VA, Rojas CA, Almeida-Santos SM (2014a) Is rainfall seasonality important for reproductive strategies in viviparous Neotropical pit vipers? A case study with *Bothrops leucurus* from the Brazilian Atlantic Forest *Herpetol J* 24: 67-75
- Barros VA, Rojas CA, Almeida-Santos, SM (2014b) Reproductive Biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. *Adv Zool* 2014: 1-11
- Barros VA, Sueiro LR, Almeida-Santos, SM (2012) Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of phylogenetic conservatism of reproductive patterns. *Herpetol J* 22: 97-104
- Bishop JE (1959) A histological and histochemical study of the kidney tubule of the common garter snake, *Thamnophis sirtalis*, with special reference to the sexual segment in the male. *J Morphol* 104: 307-357
- Booth W, Schuett GW (2011) Molecular genetic evidence for alternative reproductive strategies in North American pitvipers (Serpentes: Viperidae): long-term sperm storage and facultative parthenogenesis. *Biol J Lin Soc* 104: 934–942
- Campbell JA, Lamar WW (2004) The venomous reptiles of the Western Hemisphere. Cornell University Press, New York
- Carrasco PA, Mattoni CI, Leynaud, GC, Scrocchi, GJ (2012) Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae) *Zool Scripta* 41: 109-124

- Cree A, Guillette LJ Jr, Brown MA, Chambers GK, Cockrem JFE, Newton JD (1991) Slow estradiol-induced vitellogenesis in the tuatara, *Sphenodon punctatus*. *Phys Zool* 64: 1234-1251
- Fenwick AM, Evans JA, Parkinson, CL (2009) Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis* and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zool J Lin Soc* 156: 617-640
- Fox W (1977) The urogenital system of reptiles. In “Biology of the Reptilia” Ed by Gans C, Parsons TS, Academic Press, New York pp 1–157
- Friesen CR, Shine R, Krohmer RW, Mason RT (2013) Not just a chastity belt: the functional significance of mating plugs in garter snakes, revisited. *Biol J Lin Soc* 109: 893-907
- Giraud AR, Arzamendia V, Lopez SM, Quaini RO, Prieto Y, Leiva LA, Regner SA, Urban, JM (2008) Serpientes venenosas de Santa Fe, Argentina: conocimientos sobre su historia natural aplicados para la prevención de ofidismo. *Rev FABICIB* 12: 69-89
- Kasperoviczus KN, Almeida-Santos SM (2012) Copulatory plugs in Neotropical viperid snakes. In: World Congress of Herpetology, 2012, Vancouver, Abstracts p. 11-12. World Congress of Herpetology.
- Maluf, JRT (2000) Nova classificação climática do Estado do Rio Grande do Sul. *Rev Bras Agrometeorol* 8: 141-150.
- Martins M, Marques OAV, Sazima I (2002) Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In “Biology of the vipers” Ed by Schuett GW, Höggren M, Douglas ME, Greene HW, Eagle Publ. Mountain, Utah, pp 307-328
- Mathies, T (2011) Reproductive cycles of tropical snakes. In “Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes” Ed by RD Aldridge, DM Sever, Science Publishers, Enfield

- Moreira PL, Birkhead TR (2003) Copulatory plugs in the Iberian rock lizard do not prevent insemination by rival males. *Func Ecol* 17: 796-802.
- Moreira PL, Birkhead TR (2004) Copulatory plug displacement and prolonged copulation in the Iberian rock lizard (*Lacerta monticola*). *Behav Ecol Sociobiol* 56: 290-297
- Moreira PL, Nunes, VL, Martín J, Paulo OS (2007) Copulatory plugs do not assure high first male fertilisation success: sperm displacement in a lizard. *Behav Ecol Sociobiol* 62: 281-288
- Nunes SF, Kaefer IL, Leite PT, Cechin SZ (2010) Reproductive and feeding biology of the pitviper *Rhinocerophis alternatus* from subtropical Brazil. *Herpetol J* 20: 31-39
- Reading CJ (2004) The influence of body condition and prey availability on female breeding success in the smoothsnake (*Coronella austriaca* Laurenti). *J Zool* 264: 61-67
- Rojas CA, Barros VA, Almeida-Santos SM (2013) The reproductive cycle of the male sleep snake *Sibynomorphus mikanii* (Schlegel, 1837) from southeastern Brazil. *J Morphol* 274: 215–228
- Rojas CA, Barros VA, Almeida-Santos SM (2015) Sperm storage and morphofunctional bases of the female reproductive tract of the snake *Philodryas patagoniensis* from southeastern Brazil. *Zoomorphol* 134: 577-586
- Salomão MG, Wuster W, Puerto G, Thorpe RS, Theakston RD, Warrell DA, Duckett GJ (1999) Mt DNA evolution in neotropical pitvipers of the genus *Bothrops* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Kaupia* 8: 127-134
- Schuett GW (1992) Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers? In “Biology of the Pitvipers” Ed by JA Campbell JA, ED Brodie, Tyller, Selva, pp. 169-184
- Schwartz JM, Mc Cracken GF, Burghardt GM (1989) Multiple paternity in wild populations of the garter snake, *Thamnophis sirtalis*. *Behav Ecol Sociobiol* 25: 269-273

Shine R, Olsson MM, Mason RT (2000) Chastity belts in gartersnakes: the functional significance of mating plugs. *Biol J Lin Soc* 70: 377-390

Capítulo 6

Machos de serpente com oviduto de fêmeas?

Ocorrência de indivíduos intersexo em *Bothrops erythromelas* e *Bothrops moojeni*

Resumo

Nós descrevemos a ocorrência de intersexualidade em três indivíduos de duas espécies do gênero *Bothrops* (*B. erythromelas* e *B. moojeni*). Os dois intersexos de *B. erythromelas* apresentavam trato reprodutivo masculino de anatomia macroscópica e microscópica normal, além de dois ovidutos “completos” com início na porção latero-caudal do testículo, desembocando na vagina. Os ovidutos percorrem um trajeto ipsilateral em relação aos ductos deferentes. O intersexo de *B. moojeni* também apresentava o trato reprodutivo masculino normal e apenas um oviduto do lado direito. Este oviduto terminava em um fundo cego no terço caudal da cavidade celomática da serpente. Há diferenciação do oviduto dos intersexos em partes, porém com diferenças entre os indivíduos. As glândulas do infundíbulo e do útero podem estar totalmente ausentes ou presentes nos intersexos. Em *B. erythromelas*, a junção útero-vaginal e a vagina apresentam diferenças em relação aos sulcos da junção útero-vaginal (menos profundos nos intersexos) e epitélio da vagina (baixo e pseudoestratificado nos intersexos vs. colunar alto com muitas células secretoras para as fêmeas). Assim, podemos concluir que o oviduto destes intersexos pode ser considerado como não funcional, apesar de existirem algumas semelhanças com a morfologia do oviduto de uma fêmea de serpente sexualmente madura (e.g. pregas no infundíbulo macroscopicamente visíveis).

Palavras-chave: intersexualidade, serpentes, Viperidae, oviduto, diferenciação sexual

Introdução

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). A intersexualidade ocorre em várias linhagens de

animais, invertebrados e vertebrados, com diversas formas de expressão (Reinboth, 1975). Em vertebrados, a determinação do sexo dos embriões pode ocorrer de duas formas: no momento da fertilização, por genes que se encontram nos cromossomos sexuais (determinação sexual por genes ou por cromossomos), ou por influência do ambiente, mais especificamente, da temperatura (Langer, 2014).

A determinação sexual genética ou cromossômica ocorre na maioria das espécies de vertebrados (incluindo todos mamíferos e aves) (Langer, 2014) e a intersexualidade é uma condição rara nas espécies deste grupo. Por exemplo, estima-se que entre 0,05 a 1,7% da população humana tenha alguma condição de intersexualidade, incluindo indivíduos com variações sexuais nos cromossomos, nas gônadas ou genitais (United Nations, 2015). Em outros grupos de vertebrados em que a determinação do sexo dos embriões é dependente da temperatura a ocorrência de indivíduos intersexo nas populações pode ser mais frequente em algumas espécies, como para a tartaruga *E. orbicularis* (Pieau et al, 1998, 1999).

Os répteis podem apresentar uma ampla gama de variações em relação à determinação do sexo dos embriões de acordo com a espécie. Neste grupo, o sexo pode ser determinado geneticamente (por diferentes sistemas) ou pela temperatura, no caso de algumas espécies ovíparas de quelônios, lagartos e crocodilianos (Sarre et al., 2004, Lance, 2009, Langer et al., 2014). A influência da temperatura na determinação do sexo dos embriões nunca foi descrita para nenhuma espécie de serpente (Langer et al., 2014).

Há relatos de intersexualidade em répteis com diferentes características. Para crocodilianos, há o recente relato de Langer et al. (2014) sobre um indivíduo de crocodilo anão africano (*Osteolaemus tetraspis*), que apresentava fenótipo de macho,

ovotestes (presença de folículos ovarianos e túbulos seminíferos na gônada) e oviduto. Embora não haja dados sobre o mecanismo de determinação sexual nesta espécie, todos crocodilianos estudados até o momento apresentam determinação sexual por temperatura (Langer et al., 2014). Para quelônios com determinação sexual por temperatura, há muitos casos de intersexualidade com formação de ovotestes em indivíduos sexualmente imaturos e maduros (Langer et al., 2014).

Também há relatos de intersexos na linhagem Squamata, que agrupa lagartos, serpentes e anfisbenas. Para uma espécie de lagarto cuja determinação sexual é dependente da temperatura, a lagartixa-leopardo (*Eublepharis macularius*), a intersexualidade é comum para todas as fêmeas desta espécie. As fêmeas possuem os hemipênis, que são órgãos copuladores masculinos, além de todo sistema neuromuscular necessário para o comportamento de cópula dos machos (Holmes et al., 2005). Em duas espécies de serpentes (*Bothrops insularis* e *Pseudoficimia frontalis*), todas as fêmeas também podem ser consideradas como indivíduos intersexo pela presença universal de hemipênis nas populações, embora com diferenças entre os hemipênis de machos e fêmeas (Hardy, 1970, Kasperoviczus, 2009). Para serpentes, é conhecida apenas a determinação sexual genética ou cromossômica, porém os relatos de intersexualidade possuem muitas semelhanças com aqueles envolvendo répteis cuja determinação sexual é influenciada pela temperatura, incluindo a presença de ovotestes, como para o boídeo da ilha de Madagascar, *Sanzinia madagascariensis* (Sharpe et al., 2013) e também fêmeas com hemipênis (Pope, 1935 apud Hardy 1970, Hoge & Penha, 1959, Maclean, 1968, Hardy, 1970, Kasperoviczus, 2009). Além da ocorrência universal de hemipênis em fêmeas de *B. insularis* (Kasperoviczus, 2009) e *P. frontalis* (Hardy, 1970), há outras espécies de serpentes em que esse fenômeno parece ocorrer de forma mais rara. Uma fêmea da serpente

chinesa *Pareas stanley* apresentava hemipênis bem desenvolvidos e seis ovos aparentemente normais nos ovidutos (Pope, 1935 apud Hardy, 1970). Uma fêmea de *B. moojeni* apresentou o hemipênis direito bem desenvolvido, enquanto o esquerdo possuía menor tamanho (Maclean, 1968). Esta fêmea também estava prenhe (12 embriões bem desenvolvidos nos ovidutos) (Maclean, 1968), o que demonstra a capacidade destes indivíduos intersexo reproduzirem e deixarem descendentes. A presença de hemipênis também foi observada em fêmeas de outras espécies de lagartos, serpentes e anfisbenas (muitas vezes descrita sob a terminologia hemiclitoris) (Böhme, 1995, Ziegler & Böhme, 1997, Kasperoviczus et al., 2011), demonstrando a ocorrência de intersexualidade em todas as linhagens da Ordem Squamata.

O objetivo deste artigo é descrever três novos casos de intersexualidade em duas espécies de serpentes do gênero *Bothrops* (*B. erythromelas* e *B. moojeni*), incluindo uma análise microscópica do trato reprodutivo destes animais, que aparentemente eram machos funcionais (i.e. produziam gametas e apresentavam órgãos copuladores masculinos) com a presença do oviduto feminino. Nas serpentes, o oviduto é o órgão onde ocorrem diversos eventos do ciclo reprodutivo das fêmeas, como estocagem de esperma, fertilização e prenhez, no caso de espécies vivíparas como as jararacas do gênero *Bothrops* (Almeida-Santos & Orsi, 2002). Estes eventos ocorrem em diferentes porções do oviduto que são reconhecidas por suas diferentes características funcionais e anatômicas (Rojas et al., 2015). Diferentes porções do oviduto dos machos intersexo descritos neste estudo foram amostradas para análise de sua morfologia e comparação com as características do oviduto das fêmeas destas espécies.

Material e Métodos

Os machos com oviduto foram encontrados durante a análise macroscópica do trato reprodutor de dezenas de indivíduos, realizada durante a coleta de dados para o estudo da biologia reprodutiva de 97 machos de *Bothrops erythromelas* (Barros et al., 2014) e 33 machos de *Bothrops moojeni* (Barros et al., dados não publicados). Após o registro fotográfico da anatomia reprodutiva destes animais, foram coletadas amostras do oviduto, testículo e ducto deferente de todos os exemplares para análises histológicas. Para o exemplar de *B. moojeni* foi possível obter também uma amostra do rim para estudo do segmento sexual renal. Os tecidos foram mantidos em álcool 70% e processados para análise de microscopia de luz pelo método da parafina. A espessura dos cortes foi de 5µm e a coloração utilizada foi Hematoxilina-Eosina (H/E). Imagens dos cortes histológicos foram obtidas com o auxílio do Programa Image Pro-Express Olympus. Os indivíduos intersexo de *B. erythromelas* estão depositados na Coleção Herpetológica do Instituto Butantan (IB) e o intersexo de *B. moojeni* está depositado na Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (CHUNB). Para diferenciar as partes do oviduto seguimos a nomenclatura definida por Rojas et al. (2015), que divide o oviduto em infundíbulo (anterior e posterior), útero, junção útero-vaginal (JUV) e vagina (Capítulo 1 desta tese).

Resultados

Os dois indivíduos intersexo de *Bothrops erythromelas* (IB 52850 e IB 50949) apresentam um trato reprodutivo masculino composto por um testículo de cada lado do corpo com aspecto macroscópico normal e ductos deferentes com leve enovelamento, além de apresentarem um par de ovidutos, que os caracterizam como intersexo (Figs. 1, 2). Ambos ovidutos tem início próximo à porção latero-caudal dos

testículos (Figs. 1A, 2A) e percorrem um trajeto ipsilateral em relação aos ductos deferentes (Figs. 1B, 2B). Há divisão dos ovidutos dos indivíduos intersexo de *B. erythromelas* em diferentes partes. Em apenas um dos intersexos de *B. erythromelas* (IB 50949) é possível visualizar macroscopicamente a formação de pregas da região infundibular (Fig. 2A). Microscopicamente, há a presença de invaginações no epitélio em formato de glândulas tubulares, porém as células não estão organizadas na forma de glândulas na lâmina própria (Fig. 2D). A porção mais extensa do oviduto (Figs. 1B, 2B), que correspondente ao útero nas fêmeas, apresentou epitélio cuboide simples com células secretoras e poucas células ciliadas (Fig. 1F). Não foi observada a formação de glândulas na lâmina própria (Fig. 1F). Na região da junção útero-vaginal (JUV) foi observado epitélio pseudoestratificado com células ciliadas e secretoras, porém com a presença de sulcos menos profundos do que aqueles de uma fêmea sexualmente madura. Não há formação de glândulas na lâmina própria. Há também uma camada muscular nesta região da JUV (Fig. 2G). Macroscopicamente, na porção caudal do oviduto, próximo da cloaca, ocorre a formação de vagina nos 2 indivíduos (Figs. 1C, 2C). Microscopicamente, a região da vagina também apresentou sulcos pouco profundos e epitélio pseudoestratificado baixo (Fig. 1G).

Em relação à análise microscópica das gônadas dos intersexos de *B. erythromelas*, foi observada a organização padrão dos testículos em túbulos seminíferos, com a presença de células da linhagem seminífera como espermatogônias, além de células de Sertoli e células de Leydig (Figs. 1D, 2E). O testículo de um dos machos encontra-se em processo de autólise (Fig. 1D), enquanto o outro intersexo apresentou testículo em fase de regressão (Fig. 2E). De qualquer forma são testículos funcionais uma vez que existem espermatozoides no ducto deferente de ambos os animais. O ducto

deferente apresentou aspecto microscópico normal, com epitélio pseudoestratificado com células secretoras e células ciliadas e presença de espermatozoides no lúmen (Figs. 1E, 2F).

O intersexo de *B. moojeni* apresentava todos os órgãos do trato reprodutor masculino normais, incluindo um par de testículos, ductos deferentes e rins com presença de segmento sexual renal ativo (estrutura sexual secundária), além de um único oviduto que caracteriza a intersexualidade neste indivíduo (Fig. 3). Este oviduto tem início próximo ao testículo direito (Fig. 3A) e percorre a cavidade celomática com um trajeto ipsilateral ao ducto deferente (Fig. 3B). O final deste oviduto ocorre na região caudal da serpente, terminando em um “fundo cego” (Fig. 3C). O oviduto não se prolonga até a cloaca e não é observada a formação de vagina (Fig. 3C). A análise microscópica do início do oviduto demonstrou semelhanças com a região infundibular do oviduto das fêmeas, mostrando inclusive a formação de algumas glândulas (Fig. 3 D, E). Após esta região tem início a porção uterina, onde também podem ser encontradas glândulas, porém enquanto algumas parecem estar bem formadas (semelhantes às aquelas do útero de uma fêmea), outras apresentam o aspecto semelhante às glândulas observadas no útero de fêmeas sexualmente imaturas (Fig. 3 F, G).

Os hemipênis dos indivíduos intersexo descritos aqui já estavam evertidos total ou parcialmente nestes animais. Após uma simples análise visual, o aspecto dos hemipênis parecia normal para espécies deste gênero. Entretanto, destaco que estes não foram preparados para uma análise mais detalhada.

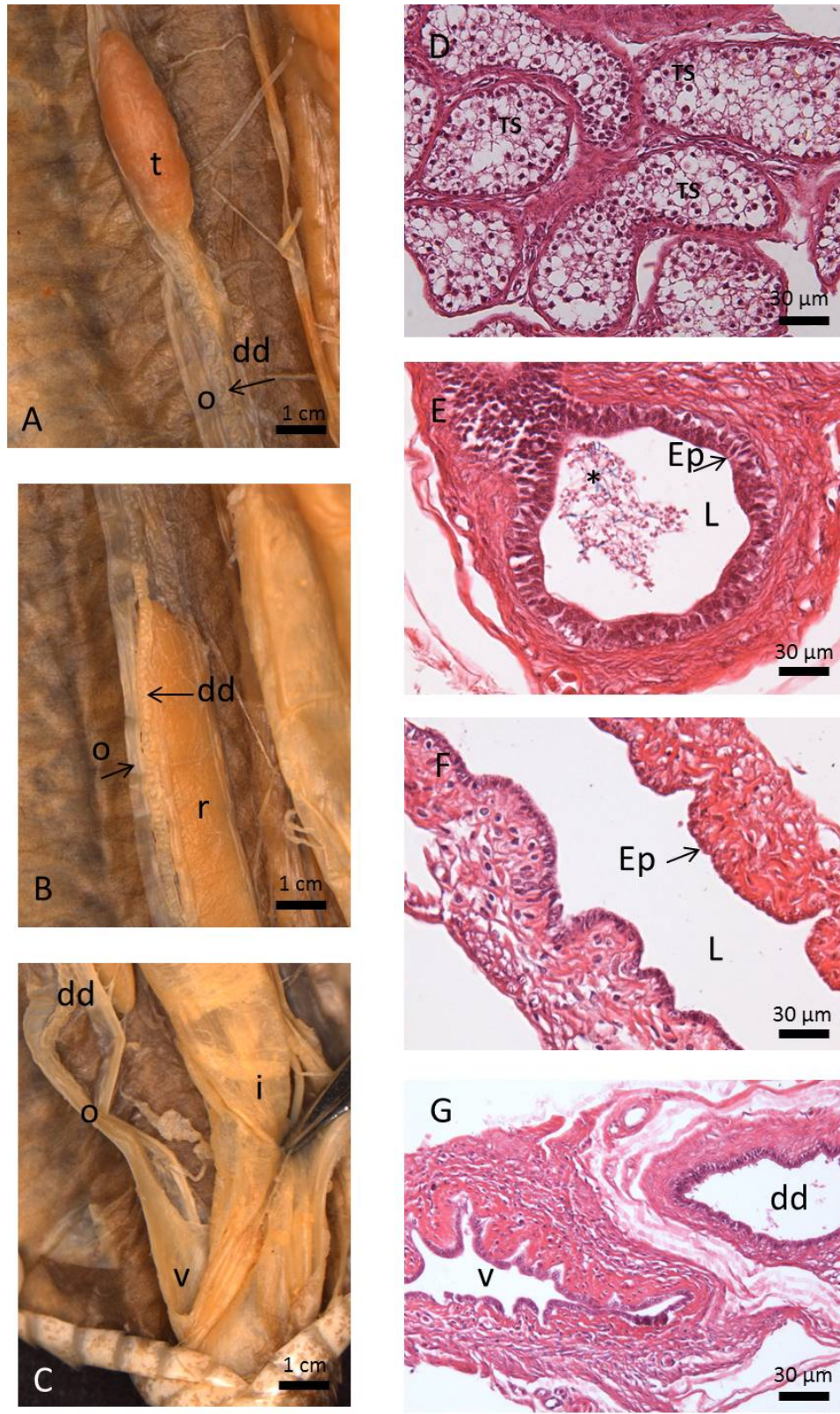


Figura 1: Macho de *Bothrops erythromelas* com ovidutos (IB 52850). A. Visão macroscópica do testículo (t), mostrando o ducto deferente (dd) e o oviduto (o). B. Região do rim (r), com o oviduto (o) e o ducto deferente (dd) lado a lado. C. Aspecto macroscópico da vagina (v), mostrando o oviduto (o), ducto deferente (dd) e o intestino (i). Aspecto microscópico. D. Testículo. E. Ducto deferente com alguns espermatozoides no lúmen. F. Útero anterior. G. Vagina e ao lado ducto deferente vazio nesta porção. TS: túbulo seminífero, Ep: epitélio, L: lúmen.

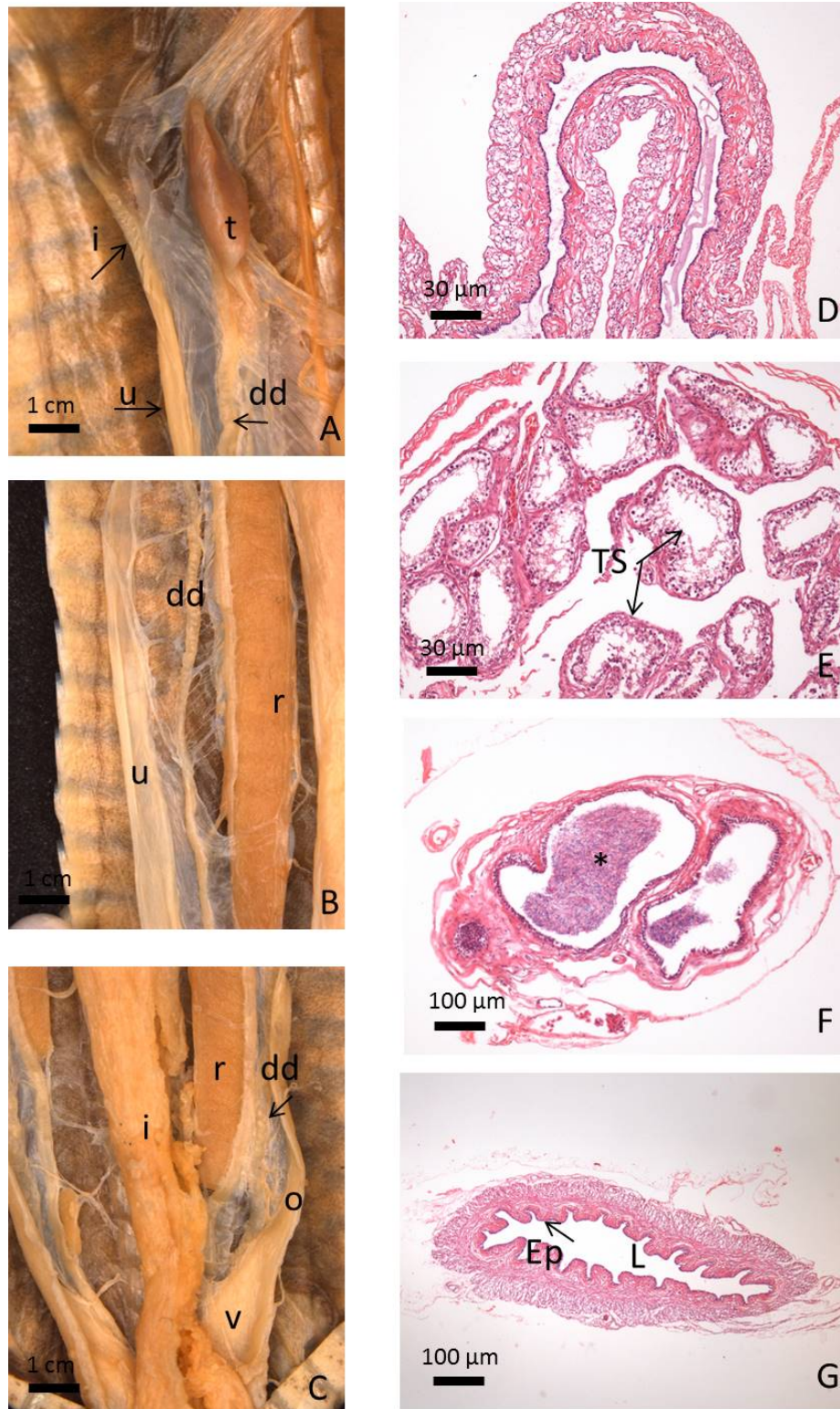


Figura 2: Macho de *Bothrops erythromelas* com oviduto (IB 50949). A. Aspecto macroscópico do testículo (t), ducto deferente (dd) e do oviduto nas regiões do infundíbulo (i) e do útero anterior (u). B. Aspecto macroscópico do útero (u) e ducto deferente (dd) na região do rim (r). C. Visão macroscópica da vagina (v), oviduto (o), ducto deferente (dd), rim (r) e intestino (i). D. Aspecto microscópico da região do infundíbulo mostrando a formação de invaginações com formato de glândulas tubulares. E. Testículo. F. Ducto deferente. O asterisco indica a presença de espermatozoides. G. Junção útero-vaginal (JUV).

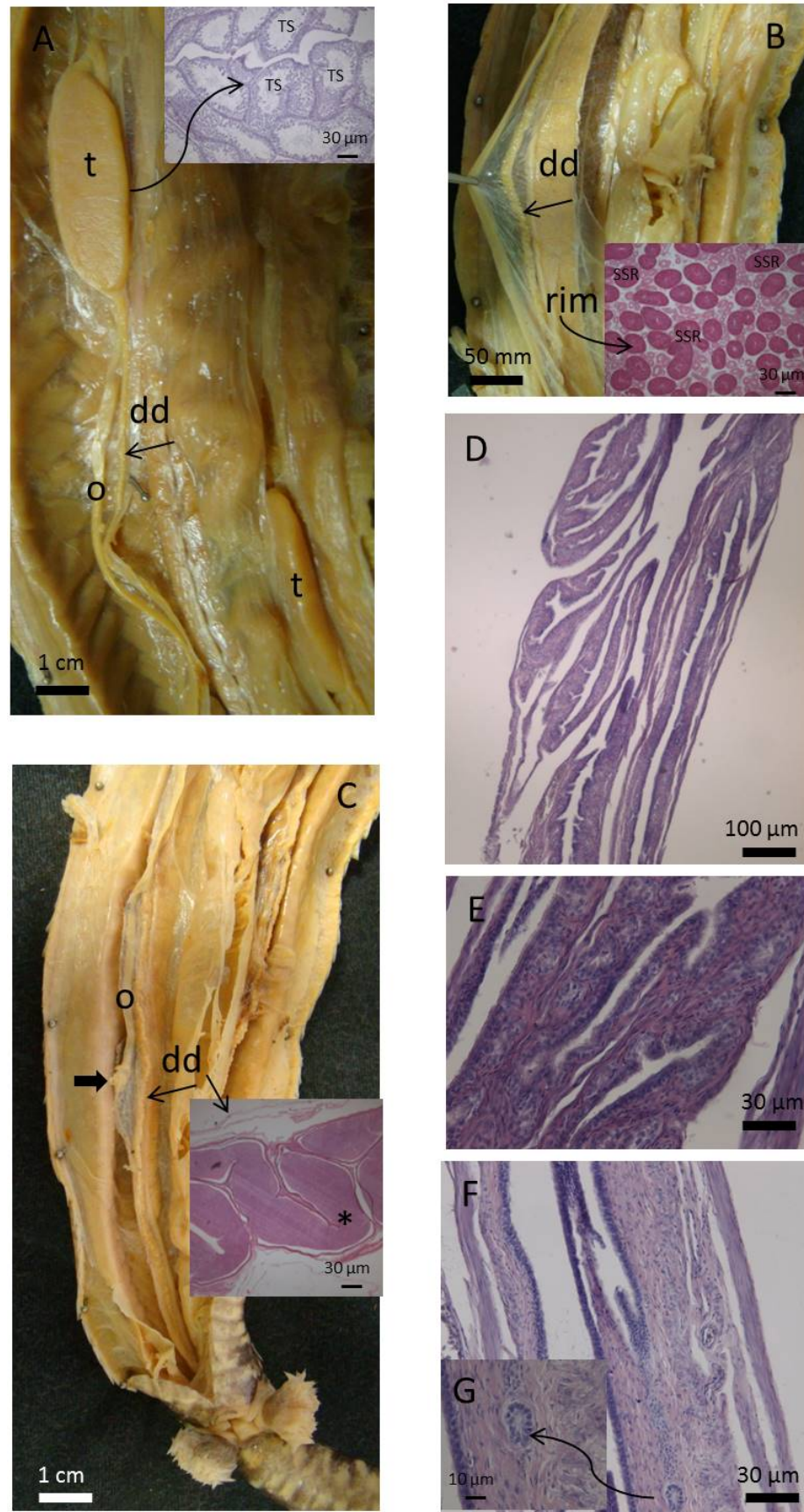


Figura 3: Macho de *Bothrops moojeni* com oviduto (CHUNB 3593). A. Visão macroscópica (e microscópica) dos testículos (t), mostrando o ducto deferente (dd), organizado em túbulos seminíferos (TS) e o oviduto (o). B. A pinça

está segurando o oviduto (o) para melhor visualização do enovelamento do ducto deferente (dd) e ao lado do ducto, observe o aspecto macroscópico e microscópico do rim, com a presença de segmento sexual renal (SSR). C. Aspecto macroscópico da região distal do indivíduo, a seta larga aponta para o final oviduto (o). Observe também o aspecto macroscópico e microscópico do ducto deferente (dd) com a presença de esperma (*). D. Aspecto microscópico do oviduto na região do infundíbulo. E. Maior aumento de D, evidenciando a presença de glândulas formadas nesta região. F. Oviduto na região do útero. G. Maior aumento de F mostrando uma glândula formada.

Discussão

Para as espécies de serpentes estudadas até hoje, a determinação sexual ocorre por determinação genética no momento da fecundação (Ciofi e Swingland, 1997) e o sexo feminino se desenvolve nas condições de heterogamia ZW, ZZW ou ZWW (Sarre et al., 2004). De acordo com o modelo clássico da embriogênese para vertebrados, há um período em que o embrião não apresenta ainda gônadas diferenciadas em ovários ou testículo e também não apresenta os ductos genitais diferenciados. Em relação a estes ductos, nas fêmeas, os ductos de Müller ou ductos paramesonéfricos presentes no embrião dão origem ao oviduto e regridem nos machos. Já os ductos de Wolff ou ductos mesonéfricos dão origem ao ducto deferente nos machos e regridem nas fêmeas. Os hormônios têm um grande papel central na diferenciação sexual nos vertebrados, em geral com o desenvolvimento do sexo masculino na presença de testosterona. A influência do estrógeno na diferenciação dos ovários em fêmeas também já foi demonstrada experimentalmente para espécies de répteis com determinação sexual por temperatura (crocodilianos, lagartos e quelônios) (Pieau, 1996, Pieau et al., 1999). A influência dos hormônios na determinação sexual durante a embriogênese também foi descrita em serpentes (Charnier, 1963, Dufaure, 1964, 1966, Raynaud e Pieau, 1985).

A testosterona provocou a masculinização parcial de embriões “geneticamente” fêmea (incluindo a hipertrofia do primórdio da genitália externa) em experimentos envolvendo a exposição de embriões de serpentes sexualmente indiferenciados à este

hormônio (Raynaud & Pieau, 1985). Por esta razão, Kasperoviczus (2009) sugere que o desenvolvimento de hemipênis nos embriões fêmeas de *B. insularis* possa estar ligado à influência de hormônios durante o período de prenhez. Já Beçak et al. (1990) sugerem que a ocorrência universal de intersexualidade em fêmeas de *B. insularis* seja desencadeada por questões genéticas relacionadas ao polimorfismo observado no cromossomo W, com alteração do gene (ou de um conjunto deles) que inibe o desenvolvimento do órgão copulatório nas fêmeas (Beçak et al., 1990). No entanto, não há ainda respostas convincentes sobre como e porque são formados indivíduos intersexo (Pieau et al., 1999, Lance, 2009). Por exemplo, nos casos descritos aqui, indivíduos com aparelho reprodutivo masculino morfologicamente normais apresentaram ovidutos com diferentes graus de semelhança em relação ao oviduto das fêmeas destas espécies de serpentes. Qual teria sido o estímulo hormonal para que tanto o aparelho reprodutor masculino quanto o oviduto se desenvolvessem? O principal estímulo hormonal para que a gônada se desenvolva como testículo seria a testosterona, então teoricamente pode ter sido possível o desenvolvimento e diferenciação parcial dos ovidutos mesmo após exposição à testosterona. Ou ainda, haveria um ou mais genes responsáveis pelo crescimento e diferenciação dos ovidutos? Poderia ter ocorrido um problema com esses genes, a interrupção do crescimento do oviduto não teria sido ativada e essa seria a razão para a ocorrência pontual destes intersexos em *B. erythromelas* e *B. moojeni* ? Um argumento a favor desta hipótese é que na serpente *Pseudoficimia frontalis* os indivíduos imaturos podem possuir os ductos genitais do sexo oposto embora o trato reprodutivo do sexo determinado geneticamente seja normal, ou seja, fêmeas imaturas apresentaram ductos deferentes e machos imaturos apresentaram ovidutos (Hardy, 1970). Por outro lado, este fenômeno só foi observado em animais de até 20 cm de comprimento rostro-

cloacal nesta espécie (Hardy, 1970). Considerando estes dados, Hardy (1970) propôs que possa haver um estágio na embriogênese de serpentes em que ambas estruturas se desenvolvam (ductos de Wolff e Muller), depois uma delas se torna vestigial e desaparece no estágio adulto.

Pequenos ou grandes remanescentes de oviduto já foram encontrados em machos adultos de diferentes espécies de répteis. Para serpentes, Volsøe (1944) foi o primeiro a descrever a presença de remanescentes da porção final cranial do ducto muleriano em machos adultos de *Tropidonotus natrix* e *Vipera berus*. O grau de desenvolvimento dos vestígios do ducto mulleriano variou entre os indivíduos nestas espécies, e algumas vezes, esteve presente em apenas um dos lados do animal (Volsøe, 1944). A conformação microscópica destes resquícios de oviduto também diferiu entre os indivíduos, em alguns casos apresentando características semelhantes ao ducto mulleriano no final dos estágios embrionários, e em outros casos apresentando uma estrutura semelhante ao oviduto de fêmeas adultas, com epitélio composto por células ciliadas, presença de glândulas e camadas musculares (Volsøe, 1944). Há diversas semelhanças entre o relatado por Volsøe (1944) e as observações relatadas aqui para estes machos de *Bothrops* com ovidutos, porém aqui há a descrição não somente de vestígios, mas também de oviduto completos em *B. erythromelas*, inclusive com a formação de vagina. Assim como apontado para as serpentes estudadas por Volsøe (1944), *B. moojeni* também apresentou a presença do oviduto somente de um lado do corpo.

O oviduto destes indivíduos intersexo pode ser dividido em diferentes partes, semelhante ao oviduto das fêmeas (Barros et al., 2014), embora nem todas as partes do

oviduto das fêmeas (Rojas et al., 2015, Capítulo 1 desta tese) tenham sido observadas nos ovidutos dos intersexos. As invaginações em formato de glândulas tubulares observadas na porção infundibular do intersexo de *B. erythromelas* (IB 50949) são semelhantes às invaginações observadas na porção anterior do infundíbulo de fêmeas sexualmente maduras desta espécie (Barros et al., 2014). Na porção infundibular do oviduto dos intersexos de *B. erythromelas* não foram observadas a presença de glândulas, que são características da porção posterior do infundíbulo de fêmeas (Rojas et al., 2015, Barros et al., 2014, Siegel et al., 2011). Já para o intersexo de *B. moojeni* pode ser observada a organização das células da região do infundíbulo em glândulas, mostrando que há variação entre o grau de desenvolvimento do oviduto dentre os indivíduos intersexo, como também apontado por Volsøe (1944) para outras espécies de serpentes. Variação também foi observada entre a região uterina do oviduto dos intersexos de *Bothrops* descritos aqui. Enquanto no oviduto de ambos os indivíduos intersexo de *B. erythromelas* não foi observada a formação de glândulas uterinas, estas foram observadas no útero do intersexo de *B. moojeni*. Para os intersexos de *B. erythromelas* que apresentaram a formação completa do oviduto, inclusive com as porções mais caudais, ou seja, JUV e vagina pode-se observar que estas partes apresentaram diferenças em relação a estas porções do oviduto em fêmeas de *B. erythromelas* (Barros et al., 2014), como a ausência de sulcos profundos tanto na JUV, quanto na vagina dos intersexos. Há também algumas semelhanças e diferenças em relação à composição das camadas de tecidos entre estas porções do oviduto em fêmeas e intersexos. Para a JUV, há a presença de camada muscular nesta porção do oviduto dos intersexos, assim como ocorre para as fêmeas (Barros et al., 2014). Já o epitélio da vagina dos intersexo era baixo e pseudoestratificado,

diferente do epitélio colunar alto com muitas células secretoras e algumas ciliadas, descrito para esta porção do oviduto em fêmeas de *B. erythromelas* (Barros et al., 2014).

O aparelho reprodutor masculino de todos os intersexos descritos aqui apresenta características semelhantes à de qualquer macho de serpente, com produção de esperma no testículo e transporte pelo ducto deferente. Para o intersexo de *B. moojeni* foi possível verificar que o segmento sexual renal (estrutura sexual secundária andrógeno dependente) também estava normal e ativo, o que é indicativo de produção normal de hormônios sexuais (testosterona) neste intersexo, o que é mais um indicativo de que estes intersexo sejam “machos funcionais”, ou seja, capazes de deixar descendentes. As serpentes possuem mecanismo de determinação sexual dos embriões por genes ou cromossomos. Desta forma, se a existência do oviduto nos machos tiver alguma relação com características sexualmente herdadas, esta característica destes machos intersexo pode ser passada para sua prole.

Como não foi observado tecido ovariano e somente túbulos seminíferos nas gônadas, estas foram consideradas como testículos e não como ovotestes. Embora não possam ter sido realizados, alguns testes de imunohistoquímica para os marcadores BPM 15 e GDF 9 poderiam ser utilizados nas gônadas destes intersexos para verificar a existência de alguma célula indiferenciada que possa ser uma precursora de ovócito, o que caracterizaria a gônada como ovoteste (Dube et al., 1998, Aaltonen et al, 1999). De qualquer forma, mesmo que a gônada produzisse folículos ovarianos, a prenhez provavelmente não seria viável nos intersexos descritos aqui. Para *B. erythromelas*, apesar dos ovidutos estarem presentes em toda sua extensão até a vagina, há muitas diferenças em relação à morfologia ovidutal de fêmeas sexualmente maduras desta

espécie (Barros et al., 2014). Já o intersexo de *B. moojeni* apresentava um único oviduto com final no último terço do comprimento do corpo, o que inviabilizaria a saída dos filhotes do corpo em caso de prenhez.

Referências

- Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppä L, Louhio H, Tuuri T, Sjöberg J, Butzow R, Hovatta O, Dale L, Rittos O, 1999. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol & Metabol* 84: 2744-2750.
- Almeida-Santos SM, Orsi AM, 2002. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morfologia e função do oviduto. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 26: 109-112.
- Barros VA, Rojas CA, Almeida-Santos SM, 2014. Reproductive Biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. *Adv Zool* 2014: 1-11.
- Beçak ML, Rabello-Gay MN, Beçak W, Soma M, Batistic RF, Trajtengertz I, 1990. The W chromosome during the evolution and in sex abnormalities of snakes. DNA content, Cbanding. In: Olmo E ed. *Cytogenetics of amphibians and reptiles*. Basel: Birkhauser Verlag, 221-240.
- Böhme W, 1995. Hemiclitoris discovered: a fully differentiated erectile structure in female monitor lizards (*Varanus ssp.*) (Reptilia: Varanidae). *J Zoo Syst Evol Res* 33:129-132.
- Charnier M, 1963. Action de l'hormone male (hexahydrobenzoate de testosterone) sur les femelles d'*Agama agama*, Saurien, Agamidae. *C R Séanc Soc Biol* 157:1470-1472.
- Ciofi C, Swingland IR, 1997. Environmental sex determination in reptiles. *Appl Anim Behav Sci* 51: 251-265.

- Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM, 1998. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 12: 1809-1817.
- Dufaure JP, 1964. Sur la réceptivité aux hormones sexuelles de tubercules génitaux de l'embryon de lézard vivipare (*Lacerta vivípara*, Jacquin). *C R Séanc Soc Biol* 158:521-523.
- Dufaure JP, 1966. Recherches descriptives et expérimentales sur les modalités et facteurs du développement de l'appareil genital chez le lézard vivipare (*Lacerta vivípara*, Jacquin). *Archs Anat Micros Morph Exp* 55:437-537.
- Hardy LM, 1970. Intersexuality in a mexican colubrid snake (*Pseudoficimia*). *Herpetologica* 26:336-343.
- Hoge AR, Belluomini HE, Schreiber G, Penha AM, 1959. Sexual abnormalities in *Bothrops insularis* (Amaral) 1921 (Serpentes). *Mem Inst Butantan* 29: 17-88.
- Holmes MM, Putz O, Crews D, Wade J, 2005. Normally occurring intersexuality and testosterone induced plasticity in the copulatory system of adult leopard geckos. *Horm Beh* 47: 439-445.
- Forbes TR, 1964. Intersexuality in Reptiles. In: Armstrong CN, Marshall AJ ed. *Intersexuality in vertebrates including man*. New York: Academic Press, 273-283.
- Kasperoviczus KN, 2009. Biologia reprodutiva da jararaca ilhoa, *Bothrops insularis* (Serpentes, Viperidae) da Ilha da Queimada Grande, São Paulo. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Kasperoviczus KN, Santos LC, Almeida-Santos SM, 2011. First report of hemiclitores in a female of the amphisbaenian *Amphisbaena microcephala* (Wagler, 1984). *Herpetol Notes* 4: 41-43.

- Lance VA, 2009. Is regulation of aromatase expression in reptiles the key to understanding temperature-dependent sex determination? *J Exp Zool* 311:314–322.
- Langer S, Ternes K, Widmar D, Mutschmann F, 2014. The first case of intersexuality in an African dwarf crocodile (*Osteolaemus tetraspis*). *Zoo Biol* 33: 459-462.
- Maclean WP, 1968. A case of intersexuality in *Bothrops moojeni* Hoge. *Copeia* 1968:170.
- Moore KL, Persaud TVN, 2000. *Embriologia básica*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 453 p.
- Pieau C, 1996. Temperature variation and sex determination in reptiles. *BioEssays* 18:19–26.
- Pieau C, Dorizzi M, Richard-Mercier N, Desvages G. 1998. Sexual differentiation of gonads as a function of temperature in the turtle *Emys orbicularis*: endocrine function, intersexuality and growth. *J Exp Zool* 281:400–408.
- Pieau C, Dorizzi M, Richard-Mercier N, 1999. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cell Mol Life Sci* 55:887–900.
- Raynaud A, Pieau C, 1985. Embryonic development of genital system. In: Gans C, Billet ed. *Biology of the Reptilia*, (Development B, v. 15). New York: John Wiley & Sons, pp. 151-300.
- Reinboth, R, 1975. *Intersexuality in the Animal Kingdom*. New York: Sringer-Verlag.
- Rojas CA, Barros VA, Almeida-Santos SM, 2015. Sperm storage and morphofunctional bases of the female reproductive tract of the snake *Philodryas patagoniensis* from southeastern Brazil. *Zoomorphol* 134: 577-586.
- Sarre SD, Georges A, Quinn A, 2004. The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *BioEssays* 26: 639–645.
- Sharpe S, Lamm CG, Killick R, 2013. Intracoelomic anaplastic sarcoma in an intersex Madagascar tree boa (*Sanzinia madagascariensis*). *J Vet Diag Inv* 25: 153-157.

Siegel DS, Miralles A, Chabarría RE, Aldridge RD, 2011. Female reproductive anatomy: cloaca, oviduct, and sperm storage. In RD Aldridge, DM Sever ed. Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes. Enfield: CRC Press, 347-409.

United Nations Office of the High Commissioner for Human Rights, 2015. Free & Equal Campaign Fact Sheet: Intersex Disponível em https://unfe.org/system/unfe-65-Intersex_Factsheet_ENGLISH.pdf . Acesso em 20 de março de 2016.

Volsøe H, 1944. Structure and seasonal variation of the male reproductive organs of *Vipera berus*. Spolia Zool Mus Hauniensis 5: 1-157.

Ziegler T, Böhme W. 1997. Genitalstrukturen und Paarungsbiologie bei squamaten Reptilien, speziell den Platynota, mit Bemerkungen zur Systematik. Mertensiella 8: 3-210.

Capítulo 7

Evolução das estratégias reprodutivas nas jararacas do gênero *Bothrops*

Manuscrito para o periódico
Herpetological Monographs

Resumo

Neste estudo revisamos os dados disponíveis sobre a reprodução no gênero *Bothrops*. A abordagem comparada das características revelou que tanto a inércia filogenética, quanto as características ambientais são importantes para a determinação dos padrões reprodutivos nas jararacas. As análises de reconstrução de caráter ancestral indicam que o padrão de dimorfismo sexual (fêmeas maiores que os machos) é conservado nesta linhagem, enquanto os padrões para maturidade sexual e tamanho máximo da ninhada são variáveis. A produção de espermatozoides nas serpentes desse gênero pode estar concentrada entre a primavera e o verão ou entre o verão e o outono, ou seja, na estação anterior ou na mesma estação em que ocorre a cópula (final do verão e outono). O segmento sexual renal dos machos, responsável por produzir o plug copulatório que é depositado na vagina das fêmeas durante o acasalamento, também apresenta um pico de hipertrofia durante estas estações. Os machos apresentam estocagem de esperma no ducto deferente e também no epidídimo, por um curto período de tempo. Após a cópula, as fêmeas também estocam esperma tanto na junção útero-vaginal, em sulcos, quanto em glândulas do infundíbulo posterior que funcionam como receptáculos de esperma. O tempo que o esperma permanece estocado no trato reprodutivo das fêmeas varia entre as espécies, com algumas espécies apresentando ovulação a partir do outono e inverno, ou mais comumente, na primavera. A maioria dos nascimentos ocorre entre o verão e o início do outono, embora também existam indivíduos e espécies plásticas, com registros de prenhez e nascimentos em outras estações, provavelmente por influência das condições ambientais.

Palavras-chaves: dimorfismo sexual, maturidade sexual, fecundidade, ciclos reprodutivos, estocagem de esperma, UMT, espermatogênese, segmento sexual renal, ducto deferente, serpentes, Viperidae

1) Introdução

A abordagem comparativa, utilizando hipóteses filogenéticas explícitas, tem sido empregada para tentar compreender diversos aspectos da biologia reprodutiva em vários grupos de animais, incluindo invertebrados (Baird et al., 2009) e vertebrados como peixes (Koya e Muñoz, 2007), répteis (Pincheira-Donoso e Tregenza, 2011, Sites-Jr et al. 2011, Rheubert et al., 2010, 2011, Werneck et al., 2009, Cox et al., 2003), aves (Mermoz e Ornelas, 2004) e mamíferos (Krajewski et al., 2000). O gênero *Bothrops* é um bom modelo para estudos sobre a evolução das estratégias reprodutivas em serpentes, pois se encontra amplamente distribuído por vários tipos de ambiente na região neotropical, além de possuir muitas espécies que são abundantes (Campbell e Lamar, 2004). Estudos sobre a ecomorfologia e a evolução dos hábitos alimentares do gênero *Bothrops* revelaram que o ancestral das jararacas era uma espécie robusta, terrestre, que vivia em florestas e apresentava hábito alimentar generalista (Martins et al., 2001, 2002).

Estas serpentes da Família Viperidae possuem grande importância para a saúde pública, pois algumas espécies muito abundantes, como *B. jararaca* e *B. atrox*, por exemplo, são responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos no Brasil (Araújo et al., 2003, Lima et al. 2009, Wen et al., 2015). Por outro lado, o gênero *Bothrops* também inclui espécies raras e algumas espécies ameaçadas de extinção. *Bothrops insularis*, endêmica da Ilha da Queimada Grande, e *Bothrops alcatraz*, endêmica da Ilha de Alcatrazes são espécies de *Bothrops* criticamente ameaçadas de extinção a nível global (IUCN, 2016), nacional (Brasil, 2014) e também pela Lista de espécies ameaçadas do Estado de São Paulo (São Paulo, 2008). Outras espécies de jararacas endêmicas de ilhas no litoral brasileiro foram descritas recentemente (*Bothrops otavioi* e *Bothrops sazimai*) e

também podem ser consideradas como ameaçadas de extinção (Barbo et al. 2012, 2016). *Bothrops otavioi* já foi classificada como criticamente ameaçada na última lista de espécies ameaçadas de extinção do Brasil (Brasil, 2014). Todas estas espécies de jararacas insulares apresentam distribuição restrita às ilhas e compartilham como principal ameaça a perda de habitat em qualidade e/ou área (Marques et al., 2004a,b, Barbo et al 2012, 2016). Dentre as ações existentes para a conservação dessas espécies atualmente, há a proposta de criação de uma unidade de conservação de proteção integral pela esfera federal (Monteiro et al., 2000) na Ilha de Alcatrazes cujo um dos objetivos é proteger *B. alcatraz* e outras espécies endêmicas da ilha; além das ações de conservação descritas no já finalizado Plano de Ação Nacional para a conservação da herpetofauna insular ameaçada de extinção (Bataus e Reis, 2011) e no atual Plano de Ação Nacional para a Conservação da Herpetofauna Ameaçada da Mata Atlântica da região sudeste do Brasil (ICMBio, 2015). A Lista Vermelha da IUCN ainda inclui outras duas espécies de *Bothrops*: *B. lojanus* do Equador, na categoria ameaçada, e *B. pirajai* do Brasil na categoria vulnerável (IUCN, 2016). Duas espécies de jararacas endêmicas da Mata Atlântica também estão presentes na lista nacional de espécies ameaçadas (Brasil, 2014) na categoria ameaçada: *B. pirajai*, conforme recomendado por Freitas et al. (2014) e *B. muriciensis*, recentemente estudada por Freitas et al. (2012).

O conhecimento sobre a biologia reprodutiva das espécies é importante para o manejo das espécies em cativeiro, o que tem impacto tanto para a formulação de estratégias de manejo e conservação eficazes para espécies ameaçadas, quanto para a manutenção de um plantel viável para extração de veneno para produção de soro antiofídico. O conhecimento sobre a biologia reprodutiva de uma espécie pode fornecer dados sobre fecundidade e maturidade sexual, que são importantes para modelos

populacionais. A aplicação do conhecimento sobre a biologia reprodutiva no manejo de uma espécie em cativeiro pode contribuir enormemente para o sucesso reprodutivo e manutenção de uma população *ex situ* geneticamente saudável. A manutenção de plantéis geneticamente viáveis em cativeiro pode ser uma medida conservacionista adequada para a conservação de algumas espécies de jararacas que apresentam distribuição muito restrita (Martins, 2004), como acontece atualmente com uma população de jararaca-ilhoa, *Bothrops insularis*, mantida em cativeiro no Instituto Butantan, cujo manejo e pesquisa já resultam na produção de conhecimento relacionado a esta espécie (e.g. Silva et al., 2015).

Nos últimos anos foram realizados estudos de história natural e biologia reprodutiva de várias espécies do gênero *Bothrops* que contribuíram muito para o conhecimento sobre a reprodução neste grupo (*B. moojeni*, Nogueira et al., 2003; *B. pauloensis*, Valdujo et al., 2002; *B. alternatus*, Nunes et al., 2010; *B. pubescens*, Hartmann et al., 2004; *B. mattogrossensis*, Monteiro et al., 2006). Recentemente, outros estudos sobre a biologia reprodutiva de diferentes espécies de jararacas passaram a incluir análises microscópicas do trato reprodutivo de fêmeas e machos, considerando assim evidências diretas para abordar eventos reprodutivos como a estocagem de esperma e a época de produção de gametas (Kasperoviczus, 2009, Barros et al., 2014a,b, Silva, 2015, Capítulos 1, 2 e 5 desta tese) e até mesmo a placentação nestas serpentes (Almeida-Santos, 2005). De uma forma geral, os estudos sobre biologia reprodutiva de serpentes podem abordar uma série de aspectos incluindo modos reprodutivos, ciclos reprodutivos, fecundidade, maturidade sexual, dimorfismo sexual, e comportamentos reprodutivos como corte, combate entre os machos e até mesmo cuidado parental pelas fêmeas (Seigel e Ford, 1987, Shine, 2003, Almeida-Santos et al., 2014).

O objetivo deste estudo é caracterizar a biologia reprodutiva do gênero *Bothrops* abordando comparativamente a época de ocorrência de diversos eventos do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas, incluindo produção de gametas, períodos de cópula, estocagem de esperma e nascimento dos filhotes; dois parâmetros de fecundidade (tamanho da ninhada e tamanho dos filhotes); o dimorfismo sexual em relação ao tamanho dos indivíduos sexualmente maduros; e o tamanho em que a maturidade sexual é atingida por ambos os sexos. Foram realizadas reconstruções do caráter ancestral para três aspectos reprodutivos (fecundidade, maturidade e dimorfismo) com o objetivo de formular hipóteses sobre a evolução destes aspectos reprodutivos nas jararacas e buscar por padrões dentro dessa linhagem, além de finalmente formular uma hipótese sobre as características reprodutivas do ancestral das serpentes do gênero *Bothrops*. Sempre que possível foram incluídos e destacados os dados sobre as espécies de jararacas ameaçadas de extinção, considerando também as espécies de jararacas apontadas por Maritz et al. (2016) como prioritárias para conservação a nível global.

1) Material e Métodos

A coleta de dados deste estudo foi realizada a partir de uma revisão na literatura em busca de quaisquer dados disponíveis sobre a biologia reprodutiva das espécies de serpentes do gênero *Bothrops*. Como definição de *Bothrops*, seguimos a proposta de Carrasco et al. (2012) que agrupa as jararacas em um grande gênero monofilético com 44 espécies: 42 listadas em Carrasco et al (2012) mais duas espécies de ilhas do litoral brasileiro descritas recentemente, *Bothrops otavioi* (Barbo et al., 2012) e *Bothrops sazimai* (Barbo et al., 2016). As filogenias utilizadas nas reconstruções de caráter ancestral neste

estudo foram adaptadas para as espécies com dados disponíveis na literatura. As filogenias seguem preferencialmente Carrasco et al. (2012), mas para o grupo *B. neuwiedi* seguimos Machado et al. (2014) e para as espécies que não estão presentes nessas filogenias seguimos Fenwick et al (2009). A espécie ameaçada *Bothrops pirajai* não está incluída em nenhuma destas propostas filogenéticas, razão pela qual os dados sobre esta espécie aparecem somente nas tabelas e não estão incluídos nas reconstruções de caráter ancestral. O Programa Mesquite foi utilizado para as análises de reconstrução de caráter ancestral. Estas foram realizadas de acordo com o método da parcimônia.

A forma de caracterização e análise de cada aspecto reprodutivo abordado neste estudo será descrita a seguir. Para caracterizar a variação no tamanho com que a maturidade sexual é atingida nas jararacas, foi possível obter dados para 11 espécies: *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. erythromelas*, *B. insularis*, *B. itapetiningae*, *B. leucurus*, *B. mattogrossensis*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. pauloensis* e *B. pubescens*. Como grupo externo foi utilizada a cascavel neotropical *Crotalus durissus*. O indicador usado para cada espécie na reconstrução de caráter ancestral foi a porcentagem do tamanho máximo em que a maturidade sexual é atingida para machos e fêmeas, considerando como variáveis categóricas (0) a maturidade sexual é atingida com até 40% do comprimento máximo do corpo, (1) a maturidade sexual é alcançada com tamanho que varia entre 40 a 50 % do comprimento máximo do corpo, (2) a maturidade sexual é alcançada com tamanho que varia entre 50 a 60 % do comprimento máximo do corpo, (3) a maturidade sexual é alcançada com tamanho que varia entre 60 a 70 % do comprimento máximo do corpo. Somente as espécies para quais estavam disponíveis dados sobre o tamanho do menor indivíduo maduro e do comprimento máximo registrado para cada sexo foram utilizados. Os critérios utilizados para determinar a maturidade sexual também são reunidos e

avaliados. Para o dimorfismo sexual foram considerados os dados sobre as comparações entre o tamanho (comprimento rostro-cloacal de machos e fêmeas) de 15 espécies de jararacas: além das 11 espécies incluídas na análise sobre maturidade sexual foi possível obter dados também para *B. asper*, *B. diporus*, *B. jararaca* e *B. pirajai*. Como grupos externos foram utilizadas as espécies *Bothrocophias hyoprora* e *Crotalus durissus*. A análise foi realizada utilizando duas variáveis categóricas: as fêmeas são o maior sexo ou as fêmeas não são o maior sexo (ou seja, machos maiores que fêmeas ou ausência de diferença no tamanho do corpo entre os sexos, como ocorre para o grupo externo *C. durissus* de acordo com a população estudada) (Barros et al., 2012). Em relação aos parâmetros de fecundidade foi possível reunir dados sobre dois parâmetros: o tamanho dos filhotes e o número de filhotes por ninhada (tamanho da ninhada). Dados sobre 12 espécies foram reunidos sobre o tamanho dos filhotes recém-nascidos: *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. caribbaeus*, *B. erythromelas*, *B. fonsecai*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. leucurus*, *B. mattogrossensis*, *B. neuwiedi*, *B. pubescens* e *B. sanctaecrucis*. Já para o tamanho da ninhada foi possível registrar a amplitude variação no número de filhotes nascidos ou de embriões nos ovidutos para um número maior de espécies, 27 no total, incluindo: *B. alcatraz*, *B. alternatus*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. bilineata*, *B. brazili*, *B. caribbaeus*, *B. cotiara*, *B. diporus*, *B. erythromelas*, *B. fonsecai*, *B. insularis*, *B. itapetiningae*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. lanceolatus*, *B. leucurus*, *B. lutzi*, *B. mattogrossensis*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. osbornei*, *B. pauloensis*, *B. pirajai*, *B. pubescens*, *B. sanctaecrucis* e *B. taeniata*. A análise de reconstrução ancestral para a fecundidade considerou o tamanho máximo de ninhada registrado como variável contínua, considerando *Bothrocophias microphthalmus*, *Bothrocophias hyoprora* e *Crotalus durissus* como grupos externos.

Os dados sobre os eventos dos ciclos reprodutivos foram organizados de acordo com os meses e estações de ocorrência. Foram reunidos dados sobre a presença de folículos em vitelogênese secundária nos ovidutos de 17 espécies do gênero *Bothrops*. Os dados sobre a sazonalidade da vitelogênese secundária em *Bothrops* seguem a minha interpretação de acordo os critérios descritos em Almeida-Santos et al. (2014), e por este motivo os dados podem ser diferentes daqueles autores que consideraram valores pré-estabelecidos (e.g. > 10 mm) para a diferenciação entre folículos em vitelogênese primária e secundária. Para determinar a época da ovulação, isto é, a passagem dos folículos ovarianos vitelogênicos para o infundíbulo, porção mais anterior do oviduto, foi utilizada a presença de embriões em estágio inicial no útero. O aspecto visual macroscópico dos embriões foi utilizado pelos autores dos diferentes estudos para dividir os embriões em estágios. Nesta revisão, para efeitos de comparação dividimos apenas os embriões em estágio inicial (presença de grande quantidade de vitelo, embrião de pequeno tamanho e pouco desenvolvido) e tardio (embriões completamente desenvolvidos). Para aquelas espécies em que os trabalhos não reportam o estágio de desenvolvimento dos embriões, todos foram considerados como embriões iniciais neste estudo. As informações sobre nascimentos dos filhotes são provenientes de cativeiro, tanto de fêmeas coletadas prenhes e mantidas em cativeiro até a parturição, quanto de indivíduos mantidos em cativeiro. Foram revisados também dados sobre comportamentos reprodutivos neste gênero. Os seguintes estudos foram utilizados para caracterizar os aspectos relacionados ao ciclo reprodutivo neste gênero: Sólorzano e Cerdas, 1989, Almeida-Santos e Salomão (2002) incluindo as referências citadas nesta revisão, Valdujo et al., 2002, Nogueira et al., 2003, Hartmann et al., 2004, Almeida-Santos, 2005, Monteiro et al., 2006, Giraudo et al., 2008, Kasperoviczus, 2009, 2013, Nunes et al.,

2010, Barros, 2011, Barros et al 2014a,b, Travaglia-Cardoso, 2011, Marques et al., 2013, Leão et al., 2014, Amaral, 2015, Silva, 2015, Martins e Liberato, 2016, Capítulos 1, 2 e 5 desta tese).

2) Resultados

3.1) Dimorfismo sexual

Em todo gênero *Bothrops* e no seu grupo irmão, gênero *Bothrocophias*, há dimorfismo sexual em relação ao tamanho (CRC) (Tabela 1). As fêmeas são maiores que os machos em toda esta linhagem e, portanto, a reconstrução de caráter ancestral indica a presença de dimorfismo sexual com as fêmeas sendo o maior sexo no ancestral das jararacas (Fig.1). No entanto, ao incluir a cascavel *C. durissus* como grupo externo (esta serpente apresenta um padrão de dimorfismo sexual diferente com os machos sendo o maior sexo (Almeida-Santos et al., 2005) ou ainda sem diferença de tamanho entre os sexos (Barros et al., 2012)), a reconstrução indica que a condição ancestral em relação ao dimorfismo sexual pode ser tanto de fêmeas quanto de machos como maior sexo para este clado (Fig. 1).

Tabela 1. Dimorfismo sexual nas espécies do gênero *Bothrops* e grupos externos utilizados na análise de reconstrução de caráter ancestral.

Espécie	Dimorfismo	Referência
<i>B. alternatus</i>	F > M	Giraud et al., 2008, Nunes et al., 2010
<i>B. asper</i>	F > M	Solórzano e Cerdas, 1989
<i>B. atrox</i>	F > M	Silva, 2015
<i>B. diporus</i>	F > M	Martins e Liberato, 2016 página da UFRS
<i>B. erythromelas</i>	F > M	Barros et al., 2014
<i>B. insularis</i> *	F > M	Marques et al., 2013
<i>B. itapetiningae</i>	F > M	Leão et al 2014
<i>B. jararaca</i>	F > M	Almeida-Santos, 2005
<i>B. leucurus</i>	F > M	Barros et al., 2014
<i>B. mato grossoensis</i>	F > M	Monteiro et al., 2006
<i>B. moojeni</i>	F > M	Nogueira et al., 2003
<i>B. neuwiedi</i>	F > M	Travaglia-Cardoso, 2011
<i>B. pauloensis</i>	F > M	Valdujo et al 2002
<i>B. pirajai</i> *	F > M	Freitas, 2008
<i>B. pubescens</i>	F > M	Hartmann et al., 2004
Grupos externos		
<i>Bothrocophias hyoprora</i>	F > M	Cisneros-Heredia et al., 2006
<i>Crotalus durissus</i>	M > F	Solórzano e Cerdas, 1989, Almeida-Santos, 2005
	F = M	Barros et al., 2012

* indicam as espécies ameaçadas

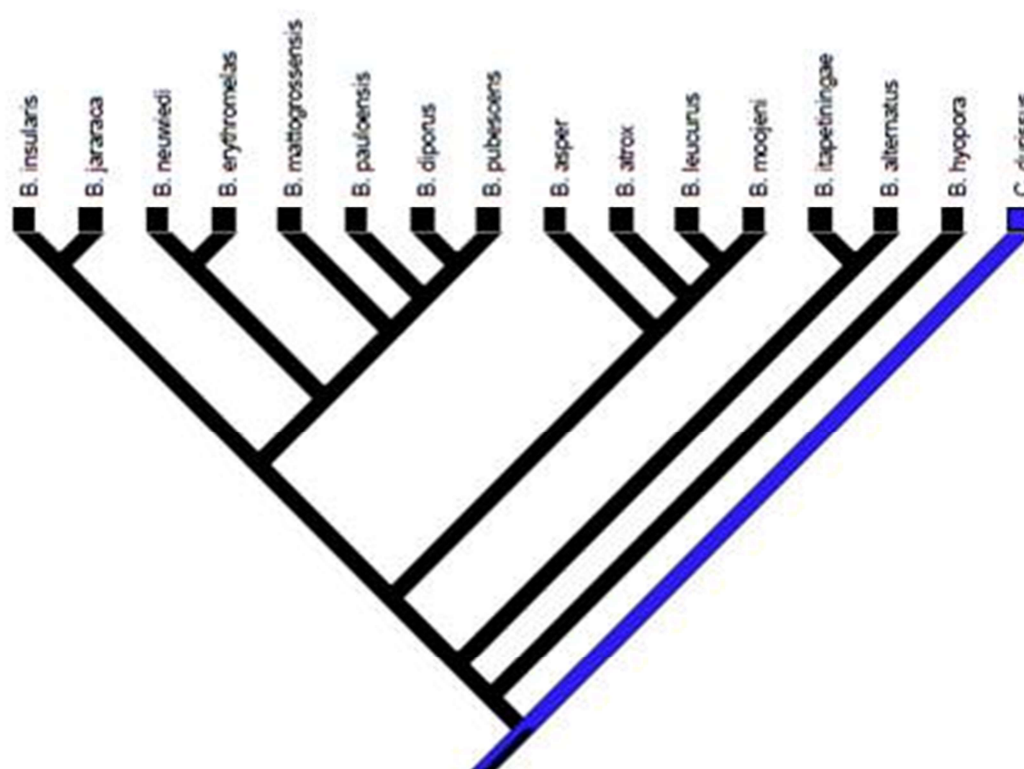


Fig. 1: Reconstrução de caráter ancestral da condição de dimorfismo sexual em relação ao tamanho para o gênero *Bothrops*, utilizando *Bothrocophias hyoprora* e *Crotalus durissus* como grupos externos. Linhas pretas: fêmeas são o maior sexo. Linha azul: fêmeas não são o maior sexo (machos são maiores que as fêmeas ou não há diferença de tamanho entre os sexos em diferentes populações).

3.2) Maturidade sexual

Dentre as 11 espécies de *Bothrops* analisadas, pode-se considerar que o percentual do tamanho máximo em que as fêmeas alcançam a maturidade apresentou uma grande amplitude de variação, com maturidade mais precoce em *B. leucurus* e mais tardia em *B. neuwiedi* (Tabela 2). Para os machos, a amplitude de variação também foi grande, com maturidade mais precoce em *B. leucurus* e mais tardia em *B. pauloensis* (Tabela 2). Considerando que diferenças nos métodos para determinação da maturidade podem ser

responsáveis por diferentes resultados, apresentamos também uma relação dos critérios para maturidade sexual utilizados em cada estudo utilizado nesta análise (Tabela 3).

A reconstrução de caráter ancestral para a maturidade sexual indicou que o caráter ancestral para maturidade nas fêmeas de *Bothrops* é alcançar a maturidade com tamanho que varia entre 50 a 60% do tamanho máximo do corpo e para os machos a condição ancestral é alcançar a maturidade entre 40 a 60% do tamanho do corpo (Fig. 2).

Tabela 2. Maturidade sexual no gênero *Bothrops*: comprimento dos menores e maiores indivíduos sexualmente maduros de cada sexo.

Espécie	Menor fêmea madura	Menor macho maduro	CRC máximo fêmeas	CRC máximo machos	Fêmeas - % do tamanho máximo em que a maturidade é atingida	Machos - % do tamanho máximo em que a maturidade é atingida	Referência
<i>B. alternatus</i>	70.1	43.8	130	88.4	54%	49.5%	Nunes et al., 2010
<i>B. atrox</i>	69	53.7	136.9	111.6	50.4%	48.1%	Silva, 2015
<i>B. erythromelas</i>	37	31.5	92	64.5	40.2 %	48.8%	Barros et al., 2014
<i>B. insularis</i>	55.5	50.5	101.6	77.6	54.6%	65.07%	Marques et al., 2013
<i>B. itapetiningae</i>	22.8	34	61.3	51.9	37.19%	65.50%	Leão et al., 2014
<i>B. leucurus</i>	44	47	136	127	32.3%	37%	Barros et al., 2014
<i>B. mattogrossensis</i>	56.8	41	128.5	83.3	44.20%	49.20%	Monteiro et al., 2006
<i>B. mojoneni</i>	76	59	133	106	57.1%	55.7%	Nogueira et al., 2003
<i>B. neuwiedi</i>	60	43	92	72	65.2 %	43.2%	Travaglia-Cardoso, 2011
<i>B. pauloensis</i>	47.5	43.0	82.3	68.5	57.7 %	62.77	Valdujo et al 2002
<i>B. pubescens</i>	62	38	115	83	53.91	45.78	Hartmann et al 2004
Grupo externo							
<i>Crotalus durissus</i>	83	82	147	146	56.5%	56.2%	Barros et al., 2012

Tabela 3. Critérios utilizados para definição da maturidade sexual nos estudos com as serpentes do gênero *Bothrops*.

Espécie	Autor(es)	Critério para maturidade sexual		
		Fêmeas	Machos	Referência
<i>B. pauloensis</i>	Valdujo et al., 2002	Ovos no oviduto ou folículos maiores que 5 mm	Ducto deferente opaco e testículos com volume aumentado	Shine, 1980
<i>B. moojeni</i>	Nogueira et al., 2003			Shine, 1977 ^a , b
<i>B. pubescens</i>	Hartmann et al., 2004	Folículos vitelogênicos ou embriões	Ducto deferente opaco e testículos com volume aumentado	Shine, 1980
<i>B. mattogrossensis</i>	Monteiro et al., 2006	Folículos maiores que 5 mm ou embriões	Ducto deferente opaco e convoluto, testículos com volume aumentado	Shine, 1980
<i>B. alternatus</i>	Nunes et al., 2010	Folículos em vitelogênese secundária (>10mm), embriões no oviduto	Ducto deferente opaco e convoluto	Shine, 1982
<i>B. neuwiedi</i>	Travaglia-Cardoso, 2011	Folículos em vitelogênese secundária, ovos nos ovidutos ou presença de corpo lúteo nos ovários	Testículo túrgido e ducto deferente opaco e enovelado, presença de esperma nas análises histológicas	Shine 1977 ^a Shine 1980
<i>B. insularis</i>	Marques et al., 2013	Folículos vitelogênicos ou embriões	Ducto deferente opaco e testículos com volume aumentado	Shine 1980 Shine 1982
<i>B. itapetiningae</i>	Leão et al., 2014	Folículos vitelogênicos e/ou ovos nos ovidutos	Ducto deferente convoluto e/ou testículos com volume aumentado	Shine, 1977 Shine, 1980
<i>B. leucurus</i>	Barros et al., 2014	Folículos em vitelogênese secundária, embriões no oviduto ou corpo lúteo nos ovários	Presença de espermatozoides nos testículos ou ductos deferentes nas análises histológicas, aspecto convoluto do ducto deferente	-----
<i>B. erythromelas</i>	Barros et al., 2014	Folículos em vitelogênese secundária, embriões no oviduto ou corpo lúteo nos ovários	Presença de espermatozoides nos testículos ou ductos deferentes nas análises histológicas, aspecto convoluto do ducto deferente	-----
<i>B. atrox</i>	Silva, 2015	Folículos em vitelogênese secundária, embriões, corpo albicans nos ovários e/ou oviduto distendido ("pós-parto")	Ductos deferentes enovelados e presença de espermátides ou espermatozoides nos testículos e ductos deferentes	-----

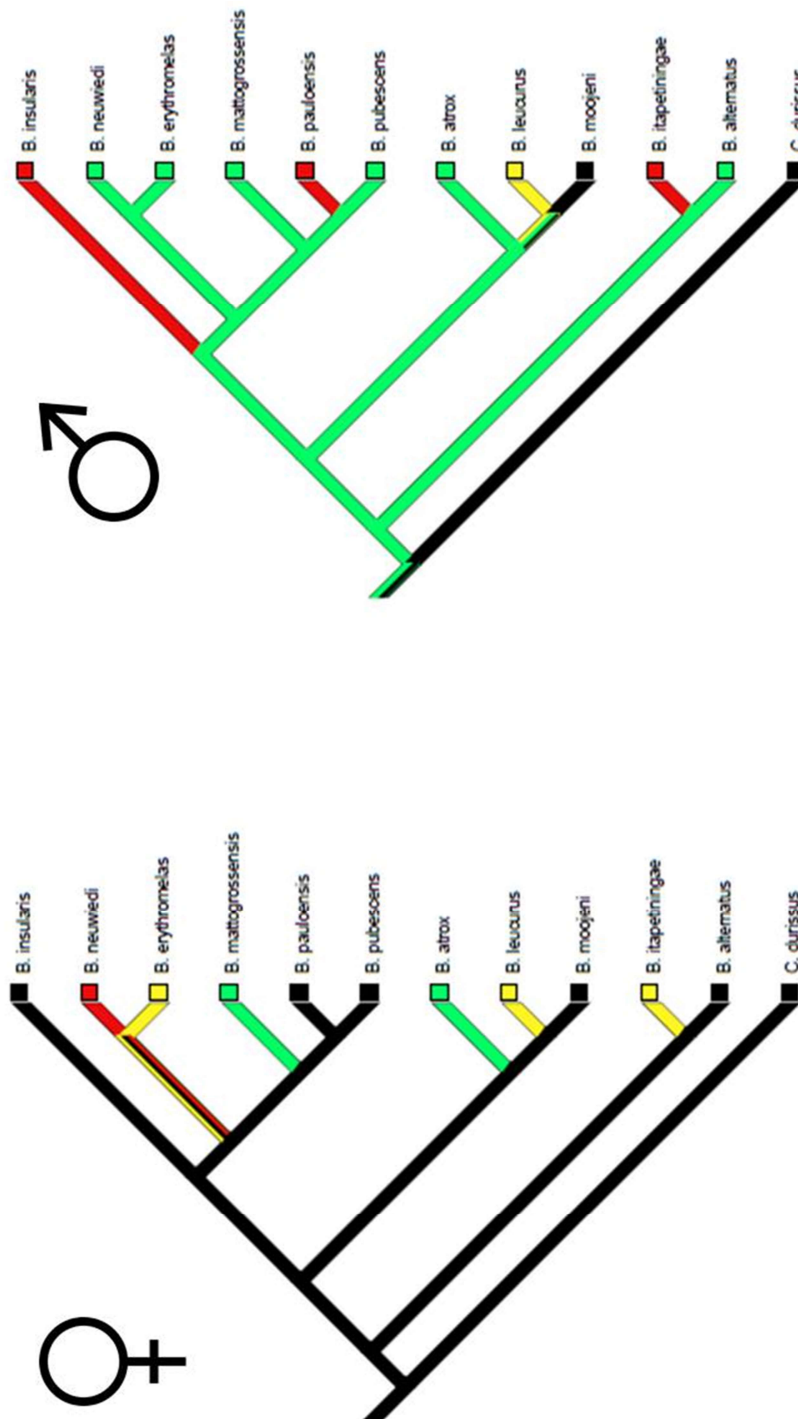


Fig. 2: Reconstrução de caráter ancestral da maturidade sexual para machos e fêmeas do gênero *Bothrops*, utilizando *Crotalus durissus* como grupo externo. Amarelo: a maturidade sexual é alcançada com até 40 % do comprimento máximo do corpo. Verde: a maturidade sexual é alcançada com tamanho que varia entre 40 a 50 % do comprimento máximo do corpo. Preto: a maturidade sexual é alcançada com tamanho que varia entre 50 a 60 % do comprimento máximo do corpo. Vermelho: a maturidade sexual é alcançada com tamanho que varia entre 60 a 70 % do comprimento máximo do corpo.

3.3) Fecundidade

3.3.1) Tamanho da ninhada

Dados sobre 27 espécies de *Bothrops* mostram que há grande amplitude de variação interespecífica e intraespecífica em relação ao tamanho da ninhada, variando de apenas um embrião em *B. alcatraz* até 86 filhotes em *B. asper* (Tabela 4). Mesmo espécies com capacidade de produzir ninhadas grandes, como *B. asper*, *B. atrox* e *B. leucurus* também apresentam fêmeas com ninhadas pequenas entre 03 e 05 indivíduos (Tabela 4). A reconstrução de caráter ancestral foi realizada utilizando o maior tamanho da ninhada registrado para cada espécie, representando a capacidade reprodutiva máxima. Nesta análise não foi considerada a influência do tamanho do corpo da fêmea sobre o tamanho da ninhada. Foram utilizados como grupos externos, duas espécies do gênero *Bothrocophias* (grupo irmão de *Bothrops*) e a cascavel *Crotalus durissus*. De acordo com a reconstrução de caráter ancestral, as fêmeas da espécie ancestral das *Bothrops* apresentavam um tamanho máximo de ninhada variando de 18 a 26 filhotes (Fig. 3).

Tabela 4. Tamanho da ninhada nas espécies do gênero *Bothrops*.

Espécie	Número de filhotes ou embriões	Referência
<i>B. alcatraz</i> *	1	Marques et al., 2002
<i>B. alternatus</i>	01 - 37	Giraud et al. 2008, Sawaya et al., 2008, Nunes et al., 2010
<i>B. asper</i>	05 - 86	Solórzano e Cerdas, 1989
<i>B. atrox</i>	03 - 43	Silva, 2015, Martins e Oliveira, 1999
<i>B. bilineata</i>	04 - 15	O'Shea, 2005
<i>B. brazili</i>	25	Cunha e Nascimento, 1981
<i>B. caribbaeus</i> *	30 - 40	Schwartz e Henderson, 1991
<i>B. cotiara</i> *	04 - 12	Mikich & Bérnils, 2004
<i>B. diporus</i>	03 - 09	Martins e Liberato, 2016
<i>B. erythromelas</i>	2 - 13	Barros et al., 2014
<i>B. fonscolombei</i>	14	Sazima e Manzani, 1998
<i>B. insularis</i>	02 - 10	Marques et al., 2013
<i>B. itapetiningae</i>	3 - 11	Sawaya et al., 2008, Leão et al., 2014
<i>B. jararaca</i>	3 - 34	Sazima, 1992
<i>B. jararacussu</i>	13 a 37	Marques, 1998
<i>B. lanceolatus</i> *	até 75	Schwartz & Henderson, 1991
<i>B. leucurus</i>	03 - 29	Barros, 2011, Lira-da-Silva et al., 1994
<i>B. lutzi</i>	6	Borges-Nojosa e Cascon, 2005
<i>B. mattogrossensis</i>	18 - 37	Monteiro et al., 2006
<i>B. moojeni</i>	03 - 32	Nogueira et al., 2003
<i>B. neuwiedi</i>	3 - 12	Travaglia-Cardoso, 2011
<i>B. osbornei</i>	18	Campbell & Lamar, 2004
<i>B. pauloensis</i>	4 - 20	Valdujo et al., 2002
<i>B. pirajai</i> *	20	Argolo, 2007
<i>B. pubescens</i>	4-25	Hartmann et al 2004
<i>B. sanctaecrucis</i>	19	Harvey et al., 2005
<i>B. taeniata</i>	7 - 17	O'Shea, 2005

* indicam as espécies ameaçadas e/ou prioritárias para conservação de acordo com Maritz et al (2016)

3.3.2) Tamanho dos filhotes

O tamanho dos filhotes nas diferentes espécies do gênero *Bothrops* pode ser considerado semelhante (Tabela 5), apesar das espécies atingirem tamanhos bastante diferentes. Por exemplo, filhotes de espécies do grupo *B. neuwiedi*, como *B. pubescens* e *B. neuwiedi*, que são espécies pequenas em relação a *B. alternatus*, possuem filhotes recém-nascidos com tamanhos semelhantes (Tabela 5).

Tabela 5. Tamanho dos filhotes recém-nascidos em *Bothrops*.

Espécie	Tamanho do filhote (CRC) (cm)	Referência
<i>B. alternatus</i>	14,6 – 25,2 (média 21)	Nunes et al., 2010
<i>B. atrox</i>	17 – 25, 4 cm (média 22,8)	Silva, 2015
<i>B. caribbaeus</i> *	28 – 30	Campbell & Lamar, 2004
<i>B. erythromelas</i>	15,78 (média)	Barros et al., 2014
<i>B. fonscai</i>	20,5 – 22,9 (média 21,8)	Sazima e Manzani, 1998
<i>B. insularis</i> *	17,4 – 28,5 (média 21,7)	Marques et al., 2013
<i>B. jararaca</i>	25,2 (média)	Almeida-Santos, 2005
<i>B. leucurus</i>	18 – 32,5	Barros et al., 2014
<i>B. mattogrossensis</i>	20 – 23,6	Monteiro et al., 2006
<i>B. neuwiedi</i>	17,5 - 29	Travaglia-Cardoso, 2011
<i>B. pubescens</i>	17 – 25	Hartmann et al., 2004
<i>B. sanctaecrucis</i>	17,7 - 24	Harvey et al., 2005

* indicam as espécies ameaçadas e/ou prioritárias para conservação de acordo com Maritz et al (2016)

3.4) Ciclos reprodutivos

Nesta seção será abordada, de forma comparativa, a época de ocorrência dos principais eventos do ciclo reprodutivo das serpentes do gênero *Bothrops*.

3.4.1) Vitelogênese

A vitelogênese secundária estendida é o padrão para as jararacas do gênero *Bothrops*. A maioria das espécies com amostragem de um número adequado de indivíduos mostra a presença de fêmeas com folículos em vitelogênese secundária em todas as estações e/ou meses do ano (e.g. *B. alternatus*, *B. diporus*, *B. jararaca*, *B. insularis*) (Fig. 4), embora seja importante ressaltar que é comum a ocorrência de um número maior de fêmeas vitelogênicas em determinados meses do que em outros para algumas espécies. Embora o ciclo vitelogênico possa ser bastante estendido, para muitas espécies há uma pausa na vitelogênese entre dezembro e janeiro (Fig. 4), época em que nascem os filhotes. O estudo de populações pode revelar padrões distintos (variação intraespecífica). Por exemplo, há variações interpopulacionais em relação à época de ocorrência da vitelogênese nas populações próximas aos oceanos Atlântico e Pacífico em *B. asper*, mas por outro lado a vitelogênese se concentra em um período de condições climáticas semelhantes nas duas populações (Solórzano e Cerdas, 1989). Outras espécies mais raras como *B. bilineatus* e *B. taeniata* possuem apenas as observações realizadas por Almeida-Santos e Salomão (2002) em seu estudo sobre estocagem de esperma e reprodução de viperídeos neotropicais como dado sobre o período de vitelogênese, necessitando ainda da descrição do ciclo reprodutivo destas e de outras espécies.

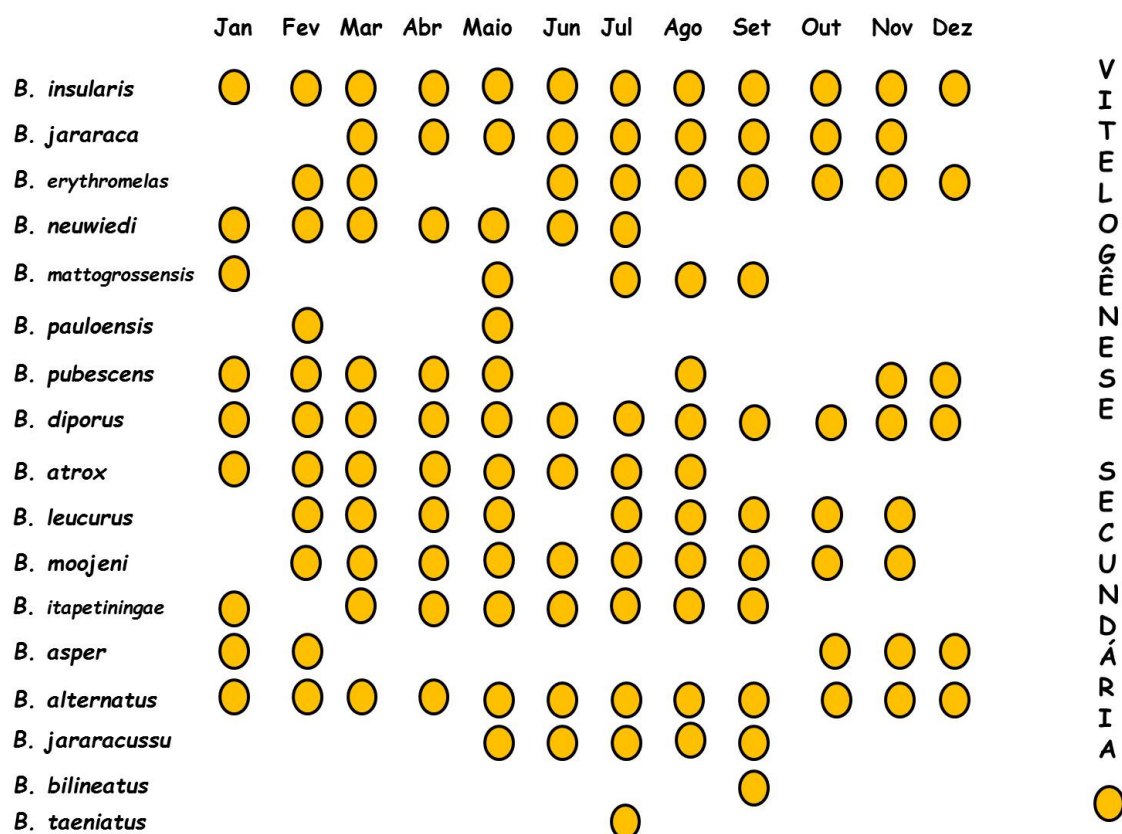


Fig. 4. Ocorrência de folículos em vitelogênese secundária em espécies do gênero *Bothrops*.

3.4.2) Acasalamento: corte, cópula e combate entre os machos

Nas serpentes do gênero *Bothrops*, diferentes comportamentos reprodutivos podem ser observados durante o acasalamento, incluindo corte, combate entre os machos e cópula. Embora grande parte das observações comportamentais tenha sido feitas em condições de cativeiro, a maior parte dos registros de acasalamento ocorreu durante os meses do final do verão e outono (março, abril, maio e junho), mas também com relatos durante o inverno para *B. insularis* e primavera para *B. moojeni*, por exemplo (Tabela 6). O combate entre os machos foi descrito apenas para espécies do grupo *B.*

atrox (*B. atrox*, *B. moojeni* e *B. leucurus*) (Almeida-Santos & Salomão, 2002). Embora a dança combate não tenha sido observada para nenhuma outra espécie de *Bothrops*, recentemente Silva et al. (2013) observaram a existência de comportamento agonístico entre machos de *B. pauloensis* em cativeiro (Tabela 6).

Tabela 6. Relatos de acasalamento para o gênero *Bothrops*

Espécie	Comportamento	Data	Condições	Referência
<i>B. jararaca</i>	Corte e cópula	Maio/2008	cativeiro	Silva et al. 2013
<i>B. insularis</i> *	Acasalamento	Agosto/Setembro	Vida livre	Amaral, 1921
<i>B. insularis</i> *	Corte	Março/Maio/Julho	Vida livre	Marques et al., 2013
<i>B. insularis</i> *	Corte	Junho	Cativeiro	Marques et al., 2013
<i>B. insularis</i> *	Acasalamento	Junho	Cativeiro	Marques et al., 2013
<i>B. pubescens</i>	Corte	Março	Vida livre	Hartmann et al., 2004
<i>B. pubescens</i>	Corte	Julho/Agosto	Cativeiro	Hartmann et al., 2004
<i>B. pubescens</i>	Acasalamento	Julho/Agosto	Cativeiro	Hartmann et al., 2004
<i>B. jararacussu</i>	Corte e cópula	01/junho/2008	Cativeiro	Silva et al. 2013
<i>B. jararacussu</i>	Acasalamento	Maio/Junho	Cativeiro	Lula et al., 1993
<i>B. pauloensis</i>	Corte e cópula	Maio/2008	Cativeiro	Silva et al. 2013
<i>B. pauloensis</i>	Comportamento agonístico entre machos	Maio/2008	Cativeiro	Silva et al. 2013
<i>B. alternatus</i>	Acasalamento	Maio/Junho	Cativeiro	Araujo and Ely, 1980
<i>B. alternatus</i>	Acasalamento	Fevereiro	Cativeiro	Pezzano, 1986
<i>B. neuwiedi</i>	Corte e cópula	Maio/2008	Cativeiro	Silva et al. 2013
<i>B. erythromelas</i>	Acasalamento	Abril/maio	Cativeiro	Machado e Cotta, 1998
<i>B. erythromelas</i>	Corte e cópula	20/Maio/2008	Cativeiro	Silva et al. 2013
<i>B. bilineata</i>	Cópula	Julho/agosto	Cativeiro	Argolo, 1996
<i>B. atrox</i>	Combate entre machos	Março/Abril	Cativeiro	Cardoso et al., 1993
<i>B. atrox</i>	Acasalamento	Março/Abril	Cativeiro	Fernandes et al., 1993
<i>B. leucurus</i>	Combate entre machos	Maio	Cativeiro	Almeida-Santos e Salomão, 2002
<i>B. leucurus</i>	Acasalamento	Maio	Cativeiro	Almeida-Santos e Salomão, 2002
<i>B. moojeni</i>	Combate entre machos	Abril e Maio	Cativeiro	Leloup, 1975, Almeida-Santos e Salomão, 2002
<i>B. moojeni</i>	Cópula	07/outubro/2008	Cativeiro	Silva et al. 2013
<i>B. moojeni</i>	Acasalamento	Março/Abril/Maio	Cativeiro	Leloup, 1975
<i>B. asper</i>	Acasalamento	Março a Junho	?	Solórzano & Cerdas, 1989; Sasa et al., 2009
<i>B. asper</i>	Acasalamento	Setembro a novembro	?	Solórzano & Cerdas, 1989; Sasa et al., 2009
<i>B. caribbaeus</i> *	Acasalamento	Março e abril	?	Daltry, 2009

* indicam as espécies ameaçadas e/ou prioritárias para conservação de acordo com Maritz et al (2016)

3.4.3) Plugs copulatórios

Kasperoviczus e Almeida-Santos (2012) descobriram a existência de plugs copulatórios nas jararacas do gênero *Bothrops*. Em animais fixados, observei que os plugs copulatórios possuem uma aparência gelatinosa e cor amarela esbranquiçada quando observados no lúmen da vagina após corte transversal do órgão para coleta e análise histológica (Fig. 5). Em relação à composição, análises histoquímicas dos plugs copulatórios de *B. alternatus* revelaram a presença de carboidratos (PAS +) e glicosaminoglicanos carboxilados (AB) (Capítulo 5). Os plugs copulatórios já foram observados em todas as estações do ano em fêmeas de *Bothrops* (Capítulos 1, 4 e 5 desta tese) (Fig. 6).



Fig. 5: Plug copulatório (*) na vagina de uma fêmea de *Bothrops alternatus* .

Plugs copulatórios

	Jan	Fev	Mar	Abr	Maio	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
<i>B. matogrossensis</i>						x		x				
<i>B. marmoratus</i>	x											
<i>B. pauloensis</i>					x					x		x
<i>B. neuwiedi</i>			x									x
<i>B. cotiara</i>										x		
<i>B. alternatus</i>			x		x				x	x	x	x

Fig. 6. Sazonalidade de ocorrência de plugs copulatórios encontrados na vagina de diferentes espécies de *Bothrops*.

3.4.4) Estocagem de esperma

A estocagem de esperma em *Bothrops* ocorre em duas porções do oviduto: em sulcos na junção útero-vaginal (JUV) e em glândulas que funcionam como receptáculos de estocagem de esperma no infundíbulo posterior (Almeida-Santos e Salomão, 2002, Almeida-Santos, 2005, Nunes et al., 2010, Kasperoviczus, 2013, Barros et al., 2014a, Silva et al., 2015, Amaral et al., 2015, Capítulo 1 desta tese).

Almeida-Santos e Salomão (2002) realizaram um amplo estudo sobre reprodução de viperídeos neotropicais incluindo 13 espécies de *Bothrops*, no qual descreveram a presença de uma contração muscular na junção útero-vaginal, nomeada pelas autoras como UMT “uterine muscular twisting”. A hipótese para a função do UMT é que esta contração mantenha os espermatozoides estocados nessa porção do oviduto durante todo o outono e inverno, impedindo sua passagem para as porções mais craniais do oviduto, como útero e infundíbulo, até o momento da ovulação na primavera (Almeida-Santos & Salomão, 1997, 2002). As autoras examinaram 162 fêmeas de diferentes

espécies do gênero *Bothrops* trazidas vivas ao Instituto Butantan e realizaram esfregaços da cloaca para busca por espermatozóides, encontrados vivos em fêmeas de *B. alternatus*, *B. ammodytoides*, *B. bilineatus*, *B. insularis*, *B. itapetiningae*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. leucurus*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. leucurus* e *B. taeniatus*, no final do outono (junho) e inverno (Almeida-Santos & Salomão, 2002). A UMT já foi observada em fêmeas em vitelogênese primária, secundária (Almeida-Santos e Salomão, 2002, Kasperoviczus, 2013, Barros et al., 2014) e até mesmo prenhes (Silva, 2015, capítulo 1 desta tese). Em função da baixa taxa de ocorrência da UMT em *B. erythromelas*, Barros et al. (2014) sugeriram que a UMT seja um caráter polimórfico nesta espécie, propondo que a estocagem por este mecanismo específico não seja obrigatória para esta espécie.

Nos últimos anos foram realizados estudos sobre a biologia reprodutiva de diferentes espécies de *Bothrops*, incluindo análises microscópicas da UMT de *B. jararaca* (Almeida-Santos, 2005, Kasperoviczus, 2013) *B. insularis* (Kasperoviczus, 2009), *B. alternatus* (Nunes et al., 2010), *B. leucurus* (Barros et al., 2014) e *B. atrox* (Silva, 2015). Em *B. insularis*, espermatozóides foram observados na JUV na presença de UMT durante o outono, inverno e a primavera (Kasperoviczus, 2009). Para *B. leucurus*, esperma estocado foi observado na UMT de uma fêmea coletada durante o outono (Barros et al., 2014a). Nestes estudos apenas a UMT foi coletada para análise histológica não havendo uma forma de controle, ou seja, não foram coletadas outras porções do oviduto, tampouco a JUV sem a presença de UMT. Kasperoviczus (2013) foi a primeira a descrever a estocagem de esperma no infundíbulo para o gênero *Bothrops*, na serpente *B. jararaca*, na qual esperma foi encontrado na UMT e infundíbulo de fêmeas amostradas durante o verão, outono e inverno. Em *B. atrox*, esperma foi observado tanto na JUV (UMT), quanto no infundíbulo, em março e abril (Silva, 2015). Para as espécies do grupo *B. neuwiedi*,

amostras de todas as regiões do oviduto foram coletadas e esperma foi encontrado entre fevereiro e março, na JUV de *B. diporus* na presença de UMT; na JUV de *B. neuwiedi* na ausência e presença de UMT; e em *B. marmoratus* na JUV e nos receptáculos de esperma do infundíbulo posterior (Capítulo 1 desta tese).

3.4.5) Ovulação e prenhez

A ovulação no gênero *Bothrops* ocorre a partir de junho (outono), com registros para *B. moojeni* (Nogueira et al., 2003), *B. itapetiningae* (Leão et al., 2014) e *B. pauloensis* (Capítulo 1). Fêmeas de *B. atrox* da Amazônia apresentaram embriões tardios em julho e agosto (inverno) (Silva, 2015), antes de todas as outras espécies do gênero (Fig. 7).

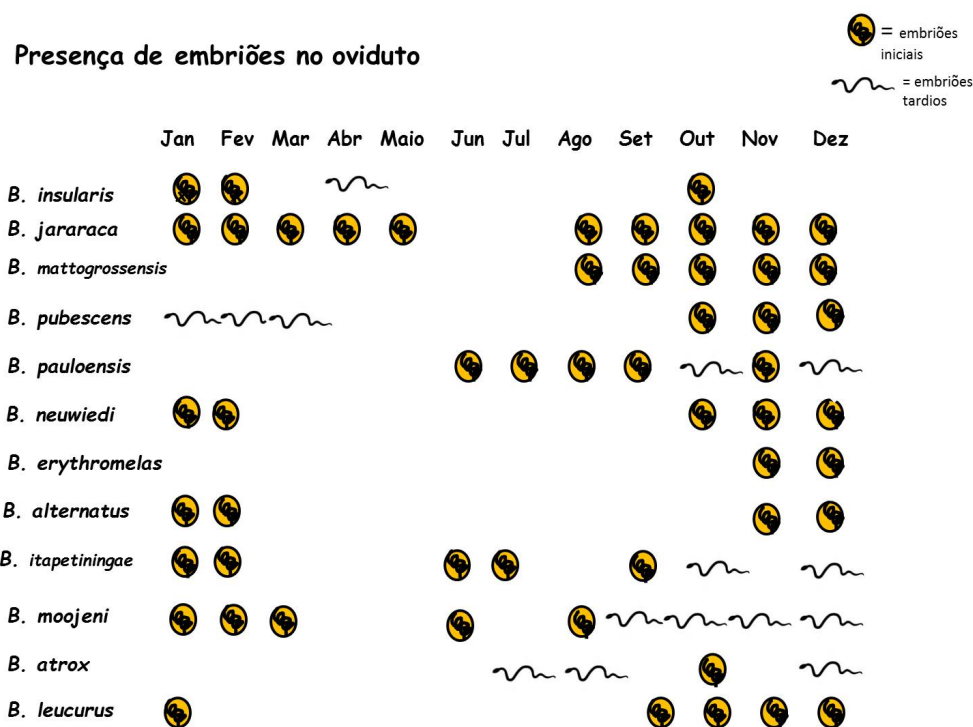


Fig. 7. Variação sazonal da presença de embriões iniciais e tardios no gênero *Bothrops*.

3.4.6) Nascimento dos filhotes

O nascimento dos filhotes está concentrado no período de dezembro a abril (verão até início do outono) para a maioria das espécies, mas há uma ampla gama de variação. *Bothrops atrox* da Amazônia possui o período de nascimento de filhotes mais extenso registrado para o gênero (Silva, 2015). *Bothrops asper* apresenta períodos diferentes para o nascimento dos filhotes nas populações das versões dos oceanos Atlântico e Pacífico na Costa Rica (Solórzano & Cerdas, 1989, Sasa et al., 2009) (Fig. 8).

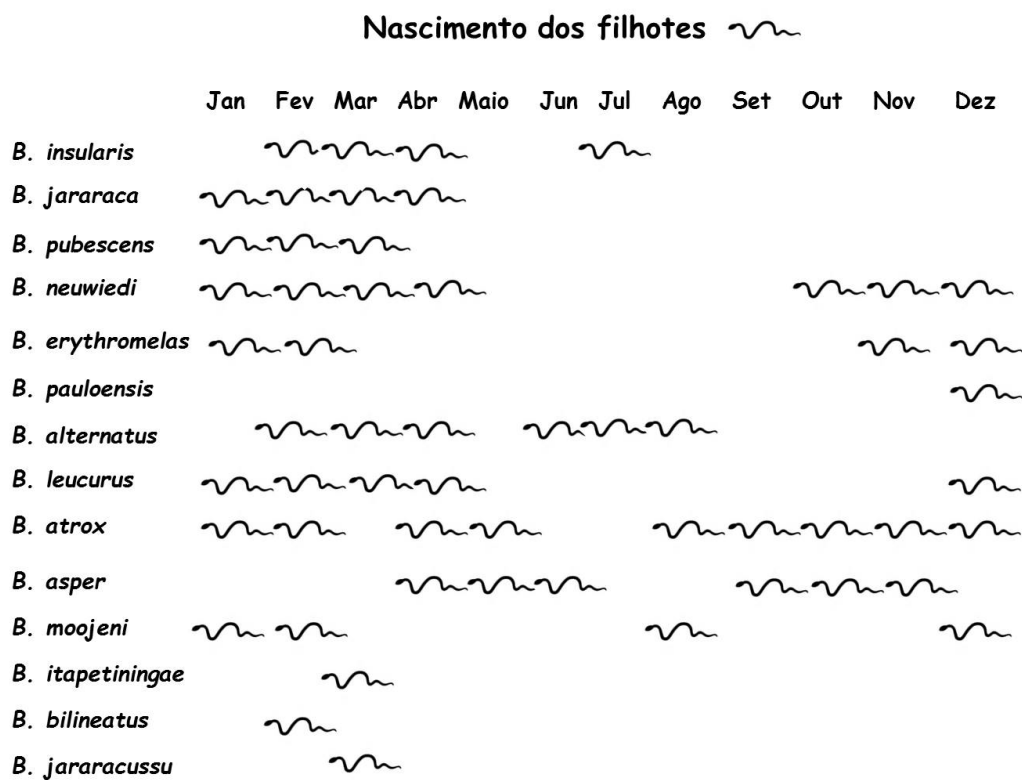


Fig. 8. Época de nascimento dos filhotes nas espécies do gênero *Bothrops*.

3.4.7) Ciclo reprodutivo dos machos: espermatogênese, segmento sexual renal e estocagem no ducto deferente

Em comparação com a quantidade de dados disponíveis sobre o ciclo reprodutivo das fêmeas de jararacas, há uma quantidade de dados significativamente menor disponível para o ciclo reprodutivo dos machos. Dados obtidos por meio de análises de microscopia das gônadas para determinação da época de produção dos espermatozóides, incluindo em alguns casos análises do ducto deferente e segmento sexual renal, estão disponíveis para algumas espécies de *Bothrops*: *B. leucurus* (Barros et al., 2014a), *B. erythromelas* (Barros et al., 2014b), *B. jararaca* (Almeida-Santos, 2005, Kasperoviczus, 2013), *B. insularis* (Kasperoviczus, 2013), *B. atrox* (Silva, 2015), *B. alternatus* (Amaral, 2015, Capítulo 5 desta tese), *B. neuwiedi* (Travaglia-Cardoso, 2011) e *B. pubescens* (Capítulo 2 desta tese).

Para *Bothrops leucurus*, da Mata Atlântica do Brasil, foram estudadas separadamente duas populações nos Estados da Bahia e Espírito Santo, com diferentes padrões de pluviosidade (chuvas constantes ao longo do ano versus período chuvoso e de seca). As duas populações apresentaram o mesmo padrão de ciclo com pico reprodutivo simultâneo à estação de acasalamento (verão e outono). A espermiogênese ocorreu durante o verão e outono, seguida de um período de regressão do epitélio seminífero durante o inverno e recrudescência na primavera. Nesta espécie, um epitélio mais alto e com criptas, característico da ampulla ductus deferentis, foi observado somente durante o outono, estação de acasalamento observada para a espécie (Barros et al., 2014b). Em *B. atrox* da Amazônia, espécie filogeneticamente próxima de *B. leucurus*, as análises histológicas indicaram presença de atividade testicular durante todo ano, com

espermio gênese e hipertrofia do SSR de novembro a abril (Silva, 2015). Regressão testicular foi observada de fevereiro a julho e regressão do SSR de maio a outubro (Silva, 2015).

Nesta tese apresentei dados sobre a população de *B. alternatus* do Rio Grande do Sul, na região sul do Brasil (Capítulo 5 desta tese). Esta espécie apresenta ampla distribuição que pertence ao grupo mais basal do gênero *Bothrops*. Assim como para outras espécies de *Bothrops*, observei variabilidade em relação ao estágio de atividade testicular e do segmento sexual renal dentre os indivíduos amostrados em uma mesma estação. A espermatogênese tem início no verão e atinge um pico entre o final do verão (março) e o outono. A espermio gênese foi observada no final do verão, ao longo do outono e no início do inverno (julho) (Capítulo 5 desta tese). A espermio gênese pode se prolongar pelo inverno até agosto em *B. alternatus* (Amaral, 2015). A regressão testicular também variou entre os indivíduos, começando no fim do verão e continuando pelo outono. A regressão total do epitélio foi observada somente na primavera (Capítulo 5 desta tese). Amaral (2015) considerando amostras que incluem populações das regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil observou regressão testicular entre julho (inverno) e novembro (primavera), recrudescência testicular entre outubro e fevereiro com hipertrofia do SSR durante períodos prolongados do outono até a primavera (abril a novembro). Em meu estudo com *B. alternatus* do sul do Brasil observei hipertrofia do SSR em todas as estações do ano, porém não em todos os indivíduos da população (Capítulo 5 desta tese). O pico de hipertrofia do SSR foi observado durante a primavera e verão, com decréscimo dos parâmetros analisados durante o outono e inverno (Capítulo 5 desta tese). Foi identificada a presença de proteínas e carboidratos nas secreções do segmento sexual renal de *B. alternatus* (Capítulo 5 desta tese).

Para o grupo *B. jararaca*, há a caracterização do ciclo dos machos de *B. jararaca* do continente (Kasperoviczus, 2013) e de *B. insularis* da Ilha da Queimada Grande (Kasperoviczus, 2009). O ciclo testicular de *B. jararaca* é caracterizado por um período de repouso durante o outono e inverno, seguido pela recrudescência na primavera e espermiogênese no verão, com pico de hipertrofia do SSR durante a primavera e verão, ou seja, simultaneamente ao pico de atividade no testículo (Kasperoviczus, 2013). Apesar do parentesco próximo com *B. jararaca*, *Bothrops insularis* apresenta um padrão diferente para o ciclo reprodutivo dos machos. No final da primavera começa a regressão do epitélio seminífero e durante o verão o testículo permanece em repouso, ou seja, com epitélio regredido. No outono ocorre o início da espermiogênese, que continua durante o inverno. No final do inverno ocorre a diminuição da atividade espermato gênica, que é intensificada novamente no início da primavera (Kasperoviczus, 2009).

Para o grupo *B. neuwiedi* há dados disponíveis sobre o ciclo dos machos de *B. pubescens* do sul do Brasil (Capítulo 2), *B. erythromelas* (Barros et al., 2014b) e *B. neuwiedi* (Travaglia-Cardoso, 2011). Além disso, há estudos nossos em andamento com *B. pauloensis*, *B. mattogrossensis*, *B. neuwiedi* e *B. marmoratus*. Para *B. pubescens*, a descrição do ciclo incluiu análises histológicas dos testículos, ductos deferentes e rins, além de uma análise sobre a influência dos parâmetros climáticos sobre as variáveis reprodutivas. O pico reprodutivo dos machos ocorre entre o verão e outono, com ocorrência de espermiogênese e pico de atividade do segmento sexual renal nestas estações. Há grande variabilidade entre os indivíduos em relação à época de ocorrência dos demais estágios espermato gênicos, com observações dos estágios de regressão durante outono, inverno e primavera; e recrudescência observada a partir do inverno, seguindo pela primavera e verão. Para o SSR, ocorre diminuição da atividade durante o

inverno e a primavera (Capítulo 2 desta tese). Para *B. neuwiedi*, há o relato de atividade espermatogênica na primavera com diminuição no verão (Travaglia-Cardoso, 2011).

O estudo do ciclo reprodutivo dos machos de *Bothrops erythromelas*, da caatinga do Brasil, contou com poucos exemplares para análise histológica, porém incluiu a análise microscópica dos testículos, ductos deferentes e dos rins (SSR) (Barros et al., 2014b). Assim como para *B. pubescens*, também há variabilidade intraespecífica em relação aos estágios reprodutivos observados entre os indivíduos dentro de uma estação (Barros et al., 2014b). A maioria dos machos é reprodutivamente ativo entre a primavera e o verão, e inativo durante o outono e inverno. No início do verão (dezembro), os machos apresentaram testículos em regressão com a presença de alguns espermatozóides remanescentes da estação reprodutiva anterior no lúmen dos túbulos seminíferos. Indivíduos com epitélio seminífero nos estágios de recrudescência e espermiogênese (com presença de grande quantidade de esperma no lúmen) foram observados durante o restante do verão (janeiro a março). Já durante o outono e inverno (abril, junho e julho) ocorreu a regressão total do epitélio seminífero. Por outro lado, alguns machos de *B. erythromelas* já iniciaram (estágio de recrudescência) ou completaram (estágio de espermiogênese) a produção de esperma durante o inverno. Na primavera foi observada a espermiogênese com grande quantidade de espermátides e presença de esperma no lúmen dos túbulos seminíferos (Barros et al., 2014b). Em relação ao ciclo do segmento sexual renal, para *B. erythromelas*, todos machos apresentaram algum grau de hipertrofia, categorizando o SSR como moderadamente ou fortemente hipertrofiado. A maioria dos machos apresentou SSR com forte hipertrofia durante a primavera e verão, e hipertrofia moderada do SSR durante o outono e inverno, porém com muitas variações entre os indivíduos da espécie em relação a este padrão (Barros et al., 2014).

Sobre o ciclo do ducto deferente, as espécies estudadas apresentaram presença de espermatozoides no ducto ao longo do ano todo (Kasperoviczus, 2009, 2013, Barros et al., 2014a,b, Silva, 2015, Amaral, 2015, Capítulos 2 e 5 desta tese). Entre as espécies estudadas, a morfologia do ducto deferente em *Bothrops* é semelhante: epitélio baixo e pseudoestratificado sobre uma membrana basal, que é circundada externamente por uma camada muscular circular e uma serosa. Em alguns machos, na região distal do ducto, o epitélio é mais alto com projeções irregulares e formação de criptas, caracterizando a presença da ampulla ductus deferentis (Barros et al., 2014a,b, Capítulos 2 e 5 desta tese). Para *B. erythromelas* foram realizadas análises histoquímicas na região distal do ducto deferente, com e sem a presença de ampulla ductus deferentis e não foram observadas diferenças nos resultados em função da conformação do ducto (Barros et al., 2014a). Reações positivas ao azul de bromofenol e PAS ocorreram na porção apical das células epiteliais do ducto deferente, inclusive na ampulla, indicando a presença de proteínas e carboidratos, respectivamente (Barros et al., 2014a). No citoplasma das células epiteliais as reações foram negativas, mas houve uma reação positiva ao PAS em uma massa de material secretor no lúmen do ducto, embora este material não estivesse em contato com o espermatozoide (Barros et al., 2014a).

4.) Discussão

Muitos estudos envolvendo diversos aspectos reprodutivos de diferentes espécies do gênero *Bothrops* foram publicados desde a primeira revisão dos dados sobre o tema, realizada por Almeida-Santos e Salomão (2002), em seu estudo sobre a reprodução das serpentes “pitvipers” da região neotropical com ênfase nas espécies do gênero *Bothrops*.

Estas autoras elaboraram a hipótese de que o padrão reprodutivo observado no gênero *Bothrops* representa a retenção de um padrão ancestral ao longo desta linhagem filogenética, propondo que as diferenças climáticas entre os ambientes ocupados pelas espécies atualmente não teriam um papel importante na determinação dos eventos reprodutivos neste gênero. Corte, acasalamento e combate ocorreriam no outono (de abril a junho); vitelogênese e estocagem de espermatozoides nas fêmeas por meio do UMT durante o outono e inverno (Julho a Setembro); fertilização na primavera (outubro a dezembro) e, finalmente, o nascimento dos filhotes ocorreria na estação chuvosa, durante o verão (janeiro a março) (Almeida-Santos & Salomão, 2002).

Apesar da biologia reprodutiva no gênero *Bothrops* permanecer totalmente desconhecida para algumas espécies, especialmente para aquelas raras e/ou com pouca representatividade em coleções científicas (e.g. *B. jonathani*, *B. medusa*, *B. pulchra*, *B. roendigeri*, *B. barnetti*, entre outras), ou ainda permanecer pouco conhecida mesmo para espécies bem amostradas, especialmente em relação ao ciclo reprodutivo dos machos (para o qual é importante contar com análises microscópicas para uma compreensão adequada dos eventos reprodutivos), o conhecimento disponível hoje já nos permite propor novas hipóteses sobre os padrões reprodutivos no gênero *Bothrops*. Este padrão parece ser influenciado tanto pela inércia filogenética quanto pelas características ambientais atuais, em função da plasticidade reprodutiva observada em alguns indivíduos e espécies.

A vitelogênese estendida ao longo da maior parte do ano é um fator comum para a maioria das espécies de *Bothrops*. Este padrão pode ser explicado pela variabilidade intraespecífica em relação à época de início da vitelogênese e/ou velocidade da deposição de vitelo entre as fêmeas. Como o conhecimento sobre os ciclos reprodutivos das

jararacas foi construído por meio de análises do trato reprodutivo de animais depositados em coleções científicas, devemos considerar que estes animais foram coletados ao longo de um período geralmente extenso e que desta forma, as fêmeas estavam sujeitas a diferentes condições ambientais, que podem ter influenciado a plasticidade observada em relação à ocorrência da vitelogênese secundária. Já foi demonstrado que as taxas de deposição de vitelo nos folículos podem variar entre os indivíduos de acordo com fatores como níveis hormonais (Cree et al., 1991) ou condição corpórea (Reading et al., 2004). A condição corpórea está ligada a quantidade de alimento consumido pelo animal, que por sua vez, tem relação com a disponibilidade de presas, cujas flutuações populacionais podem estar sujeitas às condições ambientais. Considerando todas estas questões, a ocorrência de vitelogênese secundária contínua ou estendida ao longo da maior parte do ano não pode ser utilizada isoladamente como indicador confiável de que os ciclos reprodutivos sejam contínuos para espécies de serpentes (Mathies, 2011), inclusive jararacas, já que espécies com amostragem adequada como *B. erythromelas* e *B. leucurus* apresentam vitelogênese estendida em ciclos marcadamente sazonais, ou seja, com período restrito de ocorrência de embriões nos ovidutos e nascimento dos filhotes (Barros et al., 2014a,b).

A grande maioria dos dados disponíveis sobre a estação de acasalamento é proveniente de dados obtidos em cativeiro e indica que esta ocorra entre o final do verão e o outono nas espécies deste gênero. Há também um número menor de observações de comportamentos reprodutivos em outras estações como inverno e primavera. Podemos considerar também algumas evidências indiretas para a época de acasalamento, como a presença de plugs copulatórios e a hipertrofia do segmento sexual renal, que geralmente ocorre simultaneamente à época de acasalamento em serpentes (Krohmer, 2004, Rojas

et al., 2013). Há dados disponíveis sobre o ciclo do SSR para poucas espécies de jararacas, mas se a hipertrofia do SSR coincidir com a época de acasalamento neste gênero, isso quer dizer que a época de acasalamento pode ser mais variável nesta linhagem, ou em outras palavras, ocorrer também na primavera. Para a maioria das espécies de jararacas cujo ciclo do SSR foi estudado, foi observado um pico do SSR durante a primavera e o verão (*B. alternatus*, Capítulo 5 desta tese; *B. jararaca*, Kasperoviczus 2013; *B. erythromelas*, Barros et al., 2014; e *B. atrox* com hipertrofia estendida até o início do outono – abril, Silva, 2015). Já o pico do SSR para *B. pubescens* ocorreu durante o verão e outono (Capítulo 2 desta tese), estação de acasalamento conhecida para o gênero. Barros et al. (Capítulos 4 e 5 desta tese) sugeriram que a presença do plug copulatório na primavera poderia ser considerada como um indicativo de cópula recente caso o plug durasse pouco tempo na vagina, como em *T. sirtalis*, espécie para qual o plug gelatinoso permanece na vagina por um período de 2 a 3 dias (Friesen et al., 2013, Shine et al., 2000). O plug foi observado em fêmeas de *B. alternatus* e *B. mattogrossensis* com prenhez recente (Capítulos 1 e 5 desta tese). Porém, apesar dos embriões provavelmente apresentarem uma idade superior a três dias em função de seu tamanho em *B. mattogrossensis* (Capítulo 1), o que nos leva a crer que os plugs copulatórios permaneçam por um tempo maior na vagina das jararacas do que permanecem em *T. sirtalis*, não está descartado o uso da presença do plug como indicador de cópula recente, uma vez que em função da sua composição, o plug provavelmente dure poucas semanas. De qualquer forma, até que sejam realizadas novas observações com métodos apropriados, não há como determinar a duração do plug copulatório em *Bothrops*.

A função do plug copulatório das jararacas também ainda não é conhecida. Para outras espécies de répteis Squamata, o plug pode funcionar como um espermatóforo, um

“tampão” (impedindo o vazamento de esperma), ou como um mecanismo de guarda copulatória passivo, no qual o plug funciona como um cinto de castidade, tornando a fêmea menos atraente para outros machos após a cópula (Friesen et al., 2013, Moreira et al., 2007, Shine et al., 2000). Interessante notar que para as jararacas, a mesma espécie pode apresentar mecanismos de guarda passiva (plug copulatório) (obs. pess. para *B. moojeni*) e ativa (combate entre os machos) da fêmea (Almeida-Santos & Salomão, 2002), como no caso de *B. moojeni*, uma espécie do grupo *B. atrox*, linhagem a qual está restrita o comportamento de combate entre os machos no gênero *Bothrops*.

Nos gêneros de serpentes em que ocorre o combate, os machos tendem a ser maiores que as fêmeas (Almeida-Santos e Salomão, 2002), mas para as jararacas do grupo *B. atrox* o padrão do dimorfismo sexual no gênero *Bothrops* com fêmeas maiores que machos se mantém também para estas espécies, representando a retenção do padrão ancestral, provavelmente por influência da inércia filogenética, dada a ausência de variabilidade entre as espécies apesar da presença ou ausência de combate entre os machos. Há pressão seletiva para um maior tamanho não só para os machos (em caso de combate), mas também para as fêmeas. Machos maiores e mais fortes têm maior probabilidade de serem vitoriosos nos combates e assim terem acesso às fêmeas para reproduzir e deixar descendentes (Shine, 1978, Shine, 1980, Madsen & Shine, 1993). Por outro lado, há também pressão seletiva para o aumento do tamanho nas fêmeas uma vez que a fecundidade é dependente do tamanho, ou seja, fêmeas maiores produzem ninhadas maiores (Shine, 1994).

Após o período de acasalamento nas jararacas, que primariamente ocorre no outono, há um período de estocagem de esperma em função da dissociação entre os períodos de cópula e ovulação (Almeida-Santos e Salomão, 2002, Barros et al., 2014a,b,

este trabalho). Em relação à duração da estocagem de esperma, as espécies e indivíduos parecem diferir em relação ao tempo de estocagem de esperma e também em relação à estratégia utilizada. Há dois sítios no oviduto onde a estocagem de esperma foi descrita para *Bothrops*: JUV e infundíbulo posterior (Almeida-Santos & Salomão, 2002, Kasperoviczus, 2009, Barros et al., 2014a,b, Kasperoviczus, 2013, Silva, 2015, Amaral, 2015, Capítulo 1 desta tese). Este é um caráter comum a outras espécies de serpentes, pois a estocagem de esperma nestas porções é conhecida para as serpentes em geral (Siegel et al., 2011, Almeida-Santos et al., 2014, Rojas et al., 2015). Na JUV, Almeida-Santos & (2002) Salomão descreveram a estratégia da contorção muscular uterina (“UMT” – sigla em inglês para “uterine muscular twisting”), propondo que esse funcione da seguinte forma: após a cópula no outono, ocorre a formação da contorção (UMT) na JUV das fêmeas, bloqueando a passagem do esperma para outras porções mais craniais do oviduto. O esperma permanece estocado na UMT durante todo outono e inverno, ascendendo pelo útero até o infundíbulo somente na primavera quando a contorção na JUV (UMT) se desfaz e ocorre a ovulação (Almeida-Santos e Salomão, 1997, 2002). Embora para a cascavel *C. durissus*, que possui ciclo mais marcadamente sazonal, esse esquema se aplique bem (Almeida-Santos, 2005, Barros et al., 2012), considerando as diferentes espécies do gênero *Bothrops* há grande variação em relação ao uso desta e de outras estratégias, representadas principalmente por diferenças no “timing” de ascensão do esperma para estocagem no infundíbulo e para a fertilização. Por exemplo, no oviduto de uma fêmea de *B. marmoratus* coletada na estação de acasalamento foi observado esperma no infundíbulo, inclusive dentro de receptáculos de esperma, e na JUV, cujo aspecto macroscópico era liso, sem a presença da UMT (ainda não documentada para esta espécie) (Capítulo 1 desta tese).

A UMT já foi observada em uma série de espécies do gênero *Bothrops* e na cascavel neotropical *C. durissus* (Almeida-Santos & Salomão, 1997, 2002, Almeida-Santos, 2005, Kasperoviczus, 2009, Barros et al., 2012, 2014a,b, Kasperoviczus, 2013, Silva, 2015, Amaral, 2015, Capítulos 1 e 5 desta tese), além de terem sido conduzidos estudos sobre sua formação (Yamanouye, 2004) e características do esperma estocado em seu interior (Marinho et al., 2009). Há também questionamentos sobre a função do UMT em relação à estocagem de esperma (Siegel & Sever, 2006). Os primeiros a descrever a presença da contorção foram Nilson & Andrén (1982) na serpente *Vipera berus*. Estes autores propuseram que a secreção produzida pelo SSR dos machos, introduzida na vagina da fêmea durante a cópula, seja responsável por induzir a formação da contração na JUV, provocando um bloqueio parcial da região para entrada de esperma de cópulas subsequentes com outros machos. Assim, essa contorção funcionaria como um plug copulatório, conferindo uma vantagem seletiva aos machos que copularem primeiro com as fêmeas por meio de vantagens relacionadas a competição espermática (Nilson & Andrén, 1982, Andrén & Nilson, 1987). Stille et al. (1986) conduziu alguns experimentos e propôs que a função desta contração na JUV seria para diminuir a perda de esperma por vazamento, já que a contração não impedia o esperma de cópulas subsequentes de entrar no útero. Almeida-Santos & Salomão (1997) observaram espermatozóides no interior desta contração em *C. durissus* e propuseram que a contração tivesse esta função de estocagem de esperma a longo prazo (cf. Schuett, 1992), propondo o uso da nomenclatura UMT em Almeida-Santos & Salomão (2002). A JUV é um sítio de estocagem de esperma em serpentes (Rojas et al., 2015) e há diversas evidências de que a UMT tenha uma função relacionada à estocagem de esperma como a maior taxa de encontro de esperma estocado na presença da contorção do que em sua ausência, e também em

relação ao infundíbulo que é o outro sítio de estocagem de esperma conhecido para o gênero (Capítulo 1 desta tese). Além disso, o arranjo paralelo dos espermatozoides com orientação das cabeças em direção ao epitélio na UMT de *B. moojeni* (Almeida-Santos et al., dados não publicados) está relacionado a redução da atividade espermática para diminuição dos gastos energéticos, características relacionadas à estocagem de esperma (Fox, 1956).

Independente da porção do oviduto onde o esperma permaneça estocado há também a questão do tempo de estocagem de esperma no trato reprodutivo da fêmea. Considerando o outono como estação de acasalamento, enquanto algumas espécies de jararacas parecem estocar esperma durante o outono e inverno e ovular somente na primavera, com concentração dos nascimentos no verão, outras espécies, especialmente populações de regiões com altas temperaturas ao longo do ano todo como o Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil apresentam o início da ovulação a partir do outono (junho), seguindo pelos meses de inverno (julho, agosto e setembro) até a primavera. Nestes locais onde não há realmente uma estação fria, característica do inverno, as condições ambientais são favoráveis para o desenvolvimento embrionário em qualquer época do ano e teoricamente possibilitam esse tipo de plasticidade. Na cascavel neotropical, *Crotalus durissus*, a sazonalidade dos eventos reprodutivos é bem mais marcada, com acasalamento durante o final do verão e outono, estocagem de esperma durante o outono e inverno, ovulação na primavera e nascimentos do verão até o início do outono (Almeida-Santos, 2005, Barros et al., 2012). Hoyos-Argáez (2012) estudou diferentes populações de cascavel do Brasil e corroborou a presença deste padrão conservativo nos eventos reprodutivos das fêmeas de *C. durissus*, com apenas uma fêmea

da região Centro-Oeste apresentando ovulação antecipadamente, ainda no “inverno”, diferente das jararacas para as quais este evento pode ser considerado comum.

Todavia, até este momento, apenas para *B. atrox* da Amazônia (Silva, 2015) há dados que refletem a plasticidade observada nos períodos de ovulação e prenhez no período de nascimento, que para esta espécie foi observado a partir de agosto (“inverno”). A maior parte dos nascimentos no gênero *Bothrops* é concentrada no verão, podendo ter início ainda na primavera e prolongar-se até o início do outono, dependendo da espécie. Estes dados corroboram a hipótese de ciclos reprodutivos sazonais em *Bothrops* (Almeida-Santos e Salomão, 2002). Para *Bothrocophias hyoprora* e *Bothrocophias microphthalmus*, espécies que pertencem ao grupo irmão de *Bothrops*, foi registrada a parturição durante o verão (dezembro e janeiro) (Cisneros-Heredia et al., 2006), na mesma época que para as jararacas do gênero *Bothrops*. Esse período de nascimento conservado ao longo da linhagem provavelmente representa a retenção de uma característica ancestral e a variabilidade observada em *B. atrox*, uma novidade evolutiva. Em *B. alternatus* também foram observados nascimentos em períodos “alternativos”, porém provavelmente influenciados pelas condições de cativeiro. A prenhez durante as épocas mais quentes do ano proporcionam condições ideais para o desenvolvimento embrionário em animais ectotérmicos e vivíparos (Ji et al., 2007), como as jararacas. Essa hipótese se aplica bem aos ciclos reprodutivos de serpentes “pitvipers” da região temperada, onde as estações são bem marcadas (Aldridge e Duvall, 2002, Almeida-Santos e Salomão, 2002), mas pode ser questionada para as espécies que vivem em ambientes com temperatura alta ao longo do ano, como *B. erythromelas* da caatinga, para a qual a prenhez e época de nascimentos apresentam forte sazonalidade apesar de a temperatura ambiente proporcionar condições para um desenvolvimento embrionário normal (Barros

et al., 2014b). Há outra hipótese que relaciona a época de nascimento em *Bothrops* com os padrões de precipitação. O verão é também a estação chuvosa, onde ocorre maior disponibilidade de presas (e.g. anuros) para os filhotes de jararacas (Martins et al., 2002), que teriam assim maiores chances de sobrevivência neste período em relação à estação seca (Almeida-Santos & Salomão, 2002).

O número de filhotes por ninhada é bastante variável no gênero *Bothrops* e mesmo espécies que alcançam grandes tamanhos e que podem ter ninhadas grandes, também apresentam fêmeas em suas populações que produzem ninhadas pequenas. Sobre esta questão, Barros (2011) discute que, dentre as teorias de história de vida há mais de uma explicação possível para este fenômeno. Uma delas envolve a disponibilidade de presas no ambiente. Em cativeiro, experimentos demonstram que a disponibilidade de alimento pode afetar o tamanho da ninhada em serpentes: fêmeas que receberam uma quantidade menor de presas produziram ninhadas menores em comparação com serpentes que receberam uma dieta mais calórica (Ford & Seigel, 1989, Seigel & Ford, 1991). Para Bonnet et al. (2000), a existência de fêmeas pequenas e reprodutivas em uma população pode indicar que existam táticas reprodutivas individuais e que o sucesso reprodutivo ao longo da vida de um indivíduo possa ser otimizado de diferentes formas por indivíduos diferentes em uma população de serpentes. Outra hipótese é que estas fêmeas que apresentam maturação com um tamanho pequeno e produzem pequenas ninhadas podem fazer parte de populações em crescimento, nas quais, a seleção age no sentido de favorecer o primeiro evento reprodutivo assim que este for fisiologicamente possível (Cole, 1954; Lewontin, 1965).

A maturidade sexual é uma mudança importante na história de vida de um organismo. A determinação da maturidade sexual em jararacas (e serpentes neotropicais

de uma forma geral) é uma forma bastante simplificada de caracterização, que utiliza caracteres da anatomia macroscópica (e. g. fêmeas em vitelogênese secundária ou prenhes, e machos com testículo túrgidos, com maior volume e ducto deferente enovelado e/ou opaco, seguindo Shine (1977a,b, 1980) para determinar o menor indivíduo reprodutivamente ativo de cada sexo. Todos os indivíduos maiores que o menor indivíduo maduro são considerados sexualmente maduros. São necessários estudos que aprofundem a questão da maturidade sexual, uma vez que os critérios vigentes carregam um alto grau de subjetividade. Em *B. leucurus*, análises histológicas do ducto deferente revelaram a presença de espermatozoides em um ducto deferente de aspecto macroscópico transparente (obs. pess.). Nas espécies do grupo *B. neuwiedi* as fêmeas sexualmente maduras apresentam ovidutos finos e delgados, semelhantes àqueles de fêmeas imaturas (obs. pess.). Desta forma, a definição de critérios para a caracterização da maturidade sexual com base na análise microscópica do trato reprodutivo pode auxiliar no conhecimento de estratégias reprodutivas para as espécies de *Bothrops* que hoje não conseguimos detectar utilizando o método corrente.

Análises histológicas são também fundamentais para a compreensão do ciclo reprodutivo dos machos de serpentes, cuja descrição deve incluir, pelo menos, a análise microscópica dos testículos para determinar a época de produção dos gametas corretamente (Mathies, 2011, Rojas et al. 2013, Almeida-Santos et al., 2014). Para o gênero *Bothrops*, a espermatogênese, que é sazonal, não está refletida pelo aumento do volume do testículo em *B. leucurus* e *B. erythromelas*, já que não há variação no volume do testículo entre as estações para estas espécies (Barros et al., 2014a,b). Os picos de atividade testicular (espermio gênese) no gênero *Bothrops* parecem seguir dois padrões ou o pico ocorre durante a primavera e verão ou durante o verão e outono, o que seria

equivalente a ciclos espermatogênicos dissociados e associados da cópula outonal, respectivamente. No entanto, ainda há poucos dados disponíveis para que possamos fazer generalizações. O estudo do ciclo reprodutivo dos machos de um número maior de espécies de jararacas é essencial para que possamos avançar no conhecimento sobre o ciclo reprodutivo dos machos, que envolve ainda outras questões que merecem ser estudadas como a estocagem no epidídimo e ducto deferente (Capítulo 4 desta tese), funções da ampulla ductus deferentis, ciclos do segmento sexual e até mesmo uma possível função do SSR na estocagem de esperma em função da observação inédita de esperma nos rins de *B. pubescens* (Capítulo 3 desta tese).

A reprodução no gênero *Bothrops* inclui também a ocorrência de partenogênese (Almeida-Santos e Salomão, 2002) e intersexualidade (veja Capítulo 6 desta tese). Novos estudos no gênero *Bothrops* e também no seu grupo irmão, gênero *Bothrocophias* serão importantes para a compreensão da biologia dessas serpentes.

5) Referências

- Aldridge, R.D. e Duvall, D. 2002. Evolution of the mating season in the pitvipers of North America. *Herpetological Monographs* 16, 1–25.
- Almeida-Santos, S. M. 2005. Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Almeida-Santos, S. M., Braz, H. B., Santos, L. C., Sueiro, L. R., Barros, V. A., Rojas, C. A. e Kasperoviczus, K. N. 2014. Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados. *Herpetologia Brasileira* 3: 14-24.

- Almeida-Santos, S. M. e Salomão, M. G. 1997. Long-term sperm storage in the Neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalidae). *Japanese Journal of Herpetology* 17: 46-52.
- Almeida-Santos, S. M. e Salomão, M. G. 2002. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. Pp. 445-462 in *Biology of the vipers* (G. Schuett, M. Höggren, M.E Douglas, and H. W.Greene, eds.). Carmel, Eagle Mountain, Estados Unidos.
- Amaral, A. 1921. Contribuição para o conhecimento dos ofídios do Brasil. A. Parte II. *Biologia da nova espécie, Lachesis insularis*. *Memórias do Instituto Butantan* 1: 39-44.
- Amaral, F. M. 2015. Estratégias reprodutivas da serpente *Bothrops alternatus*: influência de fatores ambientais. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Andrén, C. e Nilson, G. 1987. The copulatory plug of the adder, *Vipera berus*: does it keep sperm in or out? *Oikos* 49: 230-232.
- Araújo, F.A.A., Santalúcia, M. e Cabral, R.F. 2003. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. pp 6-12. In *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Cardoso et al. (orgs.) Sarvier: São Paulo.
- Argôlo, A.J.S. 2000. *Bothrops pirajai*. The IUCN Red List of Threatened Species 2000: e.T39902A10280801. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2000.RLTS.T39902A10280801.en>. Downloaded on 26 May 2016.
- Argôlo, A.J.S. 2007. *Bothrops pirajai* Amaral, 1923 (Serpentes, Viperidae): cópula e gestação em cativeiro. In *Anais do Congresso Brasileiro de Herpetologia*, Sociedade Brasileira de Herpetologia, Belém, Brasil.

- Baird, A. H. , Guest, J.R. e Willis, B. L. 2009. Systematic and Biogeographical Patterns in the Reproductive Biology of Scleractinian Corals. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40: 551-71.
- Barbo, F. E., Grazziotin, F. G., Sazima, I., Martins, M., Sawaya, R. J. 2012. A New and Threatened Insular Species of Lancehead from Southeastern Brazil. *Herpetologica* 68: 418-429.
- Barbo, F. E., Gasparini, J. L., Almeida, A. P., Zaher, H., Grazziotin, F. G., Gusmão, R. B., Ferrarini, J. M. G., Sawaya, R. J. 2016. Another new and threatened species of lancehead genus *Bothrops* (Serpentes, Viperidae) from Ilha dos Franceses, Southeastern Brazil. *Zootaxa* 4097: 511-529.
- Barros, V. A., Rojas, C. A. e Almeida-Santos, S. M. 2014a. Is rainfall seasonality important for reproductive strategies in viviparous Neotropical pit vipers? A case study with *Bothrops leucurus* from the Brazilian Atlantic Forest. *Herpetological Journal* 24: 67-75.
- Barros, V. A., Rojas, C. A. e Almeida-Santos, S. M. 2014b. Reproductive Biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. *Advances in Zoology* 2014: 1-11.
- Barros, V. A., Sueiro, L. R. e Almeida-Santos, S. M. 2012. Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of phylogenetic conservations of reproductive patterns. *Herpetological Journal* 22: 97-104.
- Barros, V. A. 2011. Biologia reprodutiva de três espécies de serpentes da Família Viperidae da região neotropical. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, Brasil.
- Bataus, Y. S. L., Reis, M. L. (Org.) 2011. Plano de ação nacional para a conservação da herpetofauna insular ameaçada de extinção. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, Brasília, Brasil.

- Bonnet, X., Naulleau, G., Shine, R. e Lourdaís, O. 2000. Reproductive vs ecological advantages to larger body size in female snakes, *Vipera aspis*. *Oikos* 89:509-518.
- Borges-Nojosa, D. M. e Cascon, P. 2005. Herpetofauna da Área Reserva da Serra das Almas, Ceará. Pp. 243-258. In: F. S. Araújo, M. J. N. Rodal, and M. R. V. Barbosa (eds.), *Análise das Variações da Biodiversidade do Bioma Caatinga*. Brasília, Ministério do Meio Ambiente, Brasil.
- Brasil, 2014. Portaria do Ministério do Meio Ambiente nº444, de 17 de dezembro de 2014.
- Campbell, J.A. e Lamar, W.W. 2004. The venomous reptiles of the Western Hemisphere. Ithaca and London, Cornell University Press.
- Carrasco, P.A., Mattoni, C.I., Leynaud, G.C. & Scrocchi, G.J. 2012. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologica Scripta* 41: 109-124.
- Cisneros-Heredia, D.F., Borja, M.O., Proaño, D., Touzet, J. 2006. Distribution and natural history of the Ecuadorian toad-headed pitvipers of the genus *Bothrocophias* (Squamata: Serpentes: Viperidae: Crotalinae). *Herpetozoa* 19: 17-26.
- Cisneros-Heredia, D. 2010. *Bothrops lojanus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T174144A7022705. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-4.RLTS.T174144A7022705.en>. Downloaded on **26 May 2016**.
- Cole, L.C. 1954. The population consequences of life history phenomena. *The Quarterly Review of Biology* 29:103-137.
- Cox, R.M., Skelly, S.L. e John-Alder, H.B. 2003. A comparative test of adaptive hypotheses for sexual size dimorphism in lizards. *Evolution* 57: 1653–1669.

- Cree, A., Guillette, L.J. Jr., Brown, M.A., Chambers, G. K., Cockrem, J. F. E, Newton, J. D. 1991. Slow estradiol-induced vitellogenesis in the tuatara, *Sphenodon punctatus*. *Physiological Zoology* 64: 1234-1251.
- Cunha, O.R. e Nascimento, F.P. 1981. Ofídios da Amazônia. XII – Observações sobre a viviparidade em ofídios do Pará e Maranhão (Ophidia, Aniliidae, Boidae, Colubridae e Viperidae). *Boletim do Museu Emílio Goeldi, série Zoologia* 109: 1-20.
- Daltry, J. C. 2009. The status and management of Saint Lucia's Forest Reptiles and Amphibians. Technical report nº2 to the National Forest Demarcation and Bio Physical Resource Inventory Project, FCG International Ltd, Helsinki, Finlândia.
- Fenwick, A. M., Gutberlet Jr, R. L., Evans, J. A. e Parkinson, C.L. 2009. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 156: 617–640.
- Ford, N.B. e Seigel, R.A. 1989. Phenotypic plasticity in reproductive traits: evidence from a viviparous snake. *Ecology* 70:1768-1774.
- Fox, W. 1956. Seminal receptacles of snakes. *Anatomical Records* 124: 519-539.
- Freitas, M.A., França, D.P.F., Graboski, R., Uhlig, V., Veríssimo, D. 2012. Notes on the conservation status, geographic distribution and ecology of *Bothrops muriciensis* Ferrarezzi & Freire, 2001 (Serpentes, Viperidae). *North-Western Journal of Zoology* 8: 338-343.
- Freitas, M. A. 2008. Distribuição geográfica, história natural e avaliação do status de conservação da jaracuçu-tapete, *Bothrops pirajai* Amaral, 1923. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia.

- Freitas, M. A., Argôlo, A. J. S., Gonner, C., Veríssimo, D. 2014. Biology and conservation status of Piraja's lancehead snake *Bothrops pirajai* Amaral 1923 (Serpentes, Viperidae, Brazil). *Journal of Threatened Taxa* 6: 6326-6334.
- Friesen, C.R., Shine, R., Krohmer, R.W. e Mason, R.T. 2013. Not just a chastity belt: the functional significance of mating plugs in garter snakes, revisited. *Biological Journal of the Linnean Society* 109: 893-907.
- Giraud, A. R., Arzamendia, V., Lopez, S. M., Quaini, R. O., Prieto, Y., Leiva, L. A., Regner, S. A., Urban, J. M. 2008. Serpientes venenosas de Santa Fe, Argentina: conocimientos sobre su historia natural aplicados para la prevención de ofidismo. *Revista FABICIB* 12: 69-89.
- Hartmann, M. T., Marques, O. A. V., Almeida-Santos, S. M. 2004. Reproductive biology of the southern Brazilian pitviper *Bothrops neuwiedi pubescens* (Serpentes, Viperidae). - *Amphibia-Reptilia* 25: 77-85.
- Harvey, M.B., Aparicio, J., Lucindo-Gonzales, A. 2005. Revision of the venomous snakes of Bolivia. II: The pitvipers (Serpentes: Viperidae). *Annals of Carnegie Museum* 74: 1-37.
- Hoyos-Argaéz, M. A. 2012. A cascavel neotropical *Crotalus durissus*: uma abordagem morfológica e da história natural em populações do Brasil. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2015. Portaria 48, de 06 de outubro de 2015. Aprova o Plano de Ação Nacional para Conservação da Herpetofauna Ameaçada da Mata Atlântica da Região Sudeste do Brasil – PAN Herpetofauna do Sudeste, estabelecendo seu objetivo geral, objetivos específicos, espécies contempladas, período de atuação e procedimentos de implementação, supervisão e revisão.

- Ji, X., Lin, C. X., Lin, L. H., Qiu, Q. B. e Du, Y. 2007. Evolution of viviparity in warm-climate lizards: an experimental test of the maternal manipulation hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 1037–1045.
- Leão, S. M., Pelegrin, N., Nogueira, C. C., Brandão, R. A. 2014. Natural history of *Bothrops itapetiningae* Boulenger, 1907 (Serpentes: Viperidae: Crotalinae), an endemic species of the Brazilian cerrado. *Journal of Herpetology* 48: 324-331.
- Lewontin, R. C. 1965. Selection for colonizing ability. In Baker, H.G. e Stebbins, G.L. (eds.), *The Genetics of Colonizing Species*, pp. 79-94. Academic Press, New York, Estados Unidos.
- Lima, A.C.S.F., Campos, C.E.C., Ribeiro, J.R. 2009. Epidemiological profile of snake poisoning accidents in the State of Amapá. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42: 329-335.
- Lira-da-Silva, R.M., Casais-e-Siva, L.L., Queiroz, I.B., e Nunes, T.B. 1994. Contribuição à Biologia de serpentes da Bahia, Brasil. I. Vivíparas. *Revista Brasileira de Zoologia* 11:187-193.
- Machado, T., Silva, V.X. e Silva, M.J.J. 2014. Phylogenetic relationships within *Bothrops neuwiedi* group (Serpentes, Squamata): geographically highly-structured lineages, evidence of introgressive hybridization and Neogene/ Quaternary diversification. *Molecular phylogenetics and evolution* 71: 1-14.
- Madsen, T. e Shine, R. 1993. Male mating success and body size in European grass snakes. *Copeia* 1993: 561-564.

- Marinho, C.E., Almeida-Santos, S.M., Yamasaki, S.C., Silveira, P.F. 2009. Peptidase activities in the semen from the ductus deferens and uterus of the Neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Journal of Comparative Physiology B* 179: 635-642.
- Maritz, B., Penner, J., Martins, M., Crnobrnja-Isailovic, J., Spear, S., Alencar, L.R.V., Sigala-Rodriguez, J., Messenger, K., Clark, R.W., Soorae, P., Luiselli, L., Jenkins, C., Greene, H. W. 2016. Identifying global priorities for the conservation of vipers. *Biological Conservation*. Disponível em: [http:// dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2016.05.004](http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2016.05.004)
- Marques, O.A.V. 1998. Composição faunística, história natural e ecologia de serpentes da Mata Atlântica na região da Estação Ecológica Juréia-Itatins, São Paulo, SP. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Brasil.
- Marques, O.A.V., Martins, M. e Sazima, I. 2002. A new insular species of pitviper from Brazil, with comments on evolutionary and conservation of the *Bothrops jararaca* group. *Herpetologica* 58: 303-312.
- Marques, O.A.V., Kasperoviczus, K.N., Almeida-Santos, S.M. 2013. Reproductive ecology of the threatened pitviper *Bothrops insularis* from Queimada Grande Island, Southeast Brazil. *Journal of Herpetology* 47: 393-399.
- Marques, O.A.V., Martins, M. & Sazima, I. 2004a *Bothrops alcatraz*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T46344A11050246.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T46344A11050246.en>. Downloaded on **26 May 2016**.
- Marques, O.A.V., Martins, M. & Sazima, I. 2004b. *Bothrops insularis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T2917A9493475.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T2917A9493475.en>. Downloaded on **26 May 2016**.

Martins, M. e Oliveira, M. E. 1998. Natural history of snakes in forests of the Manaus region, Central Amazonia, Brazil. *Herpetological Natural History* 6: 78-150.

O'Shea, M. 2005. *Venomous snakes of the world*. Princeton University Press, Estados Unidos.

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

Martins, M., Marques, O.A.V., Sazima, I. 2002. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: *Biology of the vipers*, 1ª Edição, p.307- 328. Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W., Eds., Utah, Eagle Publishing Mountain, Estados Unidos.

Martins, M. 2004. *Estudos em ecologia, evolução e conservação de jararacas*. Livro-docência em ecologia. Universidade de São Paulo, Brasil.

Martins, M.B. e Liberato, C.W. 2016. Reprodução e Dieta de *Bothrops diporus* (Serpentes, Viperidae). Resumo do projeto disponível em <http://www.ufrgs.br/herpetologia/Projetos/projetos%20bothrops.htm> Acesso em 01 de março de 2016.

Mathies, T. 2011. Reproductive cycles of tropical snakes. In R. D. Aldridge and D. M. Sever (Eds): *Reproductive Biology and Philogeny of Snakes*. CRC Press, Enfield.

Mermoz, M.E. e Ornelas, J.F. 2004. Phylogenetic analysis of life-history adaptations in parasitic cowbirds. *Behavioral Ecology* 15: 109–119.

Mikich, S.B. & Bérnils, R.S. 2004. *Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná*. Brasil: Estado do Paraná. Retrieved from <http://www.pr.gov.br/iap>.

Monteiro, C., Montgomery, C. E., Spina, F., Sawaya, R. J. e, Martins, M. 2006. Feeding, reproduction, and morphology of *Bothrops mattogrossensis* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) in the Brazilian Pantanal. *Journal of Herpetology* 40:408-413.

Monteiro, A.B., Drummond, G.M., Paglia, A.P (Eds.) 2008. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção / Brasília, DF : MMA; Belo Horizonte, MG : Fundação Biodiversitas, 2008. 1420 p.

Moreira, P. L., Nunes, V. L., Martín, J. e Paulo, O. S. 2007. Copulatory plugs do not assure high first male fertilisation success: sperm displacement in a lizard. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62: 281-288.

Nilson, G. e Andrén, C. 1982. Function of renal sex secretion and male hierarchy in the adder, *Vipera berus*, during reproduction. *Hormones and Behavior* 16: 404-413.

Nogueira, C., Sawaya, R. J. e Martins, M. 2003. Ecology of the pitviper, *Bothrops moojeni* in the Brazilian Cerrado. *Journal of Herpetology* 37: 653-659.

Nunes, S. F., Kaefer, I. L., Leite, P. T., Cechin, S. Z. 2010. Reproductive and feeding biology of the pitviper *Rhinocerothis alternatus* from subtropical Brazil. *Herpetological Journal* 20: 31-39.

Kasperoviczus, K.N. 2009. Biologia reprodutiva da jararaca ilhoa, *Bothrops insularis* (Serpentes, Viperidae) da Ilha da Queimada Grande, São Paulo. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil.

Kasperoviczus, K. N. e Almeida-Santos, S. M. 2012. Copulatory plugs in Neotropical viperid snakes. In: World Congress of Herpetology, 2012, Vancouver, Abstracts p. 11-12. World Congress of Herpetology.

- Kasperoviczus, K. N. 2013. Evolução das estratégias reprodutivas de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Koya, Y. e Muñoz, M. 2007. Comparative study on ovarian structures in scorpaenids: possible evolutionary process of reproductive mode. *Ichthyological Research* 54: 221-230.
- Krajewski, C., Woolley, P. A., Westerman, M. 2000. The evolution of reproductive strategies in dasyurid marsupials: implications of molecular phylogeny. *Biological Journal of the Linnean Society* 71: 417- 435.
- Krohmer, R.W. 2004. Variation in seasonal ultrastructure of sexual granules in the renal sexual segment of the Northern Water Snake, *Nerodia sipedon sipedon*. *Journal of Morphology*, 261: 70-80.
- Leloup, P. 1975. Observation sur la reproduction de *Bothrops moojeni* em captivité. *Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia* 62:173-201.
- Pincheira-Donoso, D. e Tregenza, T. 2011. Fecundity selection and the evolution of reproductive output and sex-specific body size in the *Liolaemus* lizard adaptive radiation. *Evolutionary Biology* 38: 197-207.
- Reading, C.J. 2004. The influence of body condition and prey availability on female breeding success in the smoothsnake (*Coronella austriaca* Laurenti). *Journal of Zoology* 264: 61-67.
- Rheubert, J.L., McMahan, C.D., Sever, D.M., Bundy, M.R., Siegel, D.S. e Gribbins, K.M. 2010. Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). VII. Spermatozoon morphology and evolutionary trends of sperm characters in snakes. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 48: 366-375.

- Rheubert, J.L., Murray, C.M, Siegel, D.S., Babin, J. e Sever, D.M. 2011. The Sexual Segment of *Hemidactylus turcicus* and the Evolution of Sexual Segment Location in Squamata. *Journal of Morphology* 272: 802–813.
- Rojas, C. A., Barros, V. A. e Almeida-Santos, S. M. 2013. The reproductive cycle of the male sleep snake *Sibynomorphus mikanii* (Schlegel, 1837) from southeastern Brazil. *Journal of Morphology* 274: 215–228.
- Rojas, C.A., Barros, V.A. e Almeida-Santos, S.M. 2015. Sperm storage and morphofunctional bases of the female reproductive tract of the snake *Philodryas patagoniensis* from southeastern Brazil. *Zoomorphology* 134: 577-586.
- São Paulo. 2008. Decreto Estadual nº 53.494, de 2 de outubro de 2008. Declara as espécies da fauna silvestre ameaçadas, as quase ameaçadas, as colapsadas, sobrexplotadas, ameaçadas de sobrexplotação e com dados insuficientes para avaliação no Estado de São Paulo e dá providências correlatas. *Diário Oficial do Estado de São Paulo* 1: 118-187.
- Sasa, M., Wasko, D.K. e Lamar, W.W. 2009. Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. *Toxicon* 54: 904–922.
- Sawaya, R.J., Marques, O.A.V. e Martins, M. 2008. Composição e história natural das serpentes de Cerrado de Itirapina, São Paulo, Sudeste do Brasil. 2008. *Biota neotropica* 8: 127-149.
- Sazima, I. 1992. Natural history of the jararaca pitviper *Bothrops jararaca* in southeastern Brazil. Pp. 199-216 In J.A. Campbell & Brodie, E. D. Jr. (Eds.), *Biology of the pitvipers*. Selva, Tyler, Texas, Estados Unidos.
- Sazima, I., Manzani, P.R. 1998. Natural history notes: *Bothrops fonscai* (Fonseca's lancehead). *Reproduction and Size*. *Herpetological Review*, 29: 102-103.

- Schuett, G.W. 1992. Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers? In Campbell, J.A. e Brodie, E.D. (Eds.). *Biology of the Pitivipers*, pp. 169-184. Tyller, Selva, Estados Unidos.
- Schwartz, A., Henderson, R.W. 1991. *Amphibians and Reptiles of the West Indies. Descriptions, Distributions, and Natural History*. Gainesville, Florida, Univ. Florida Press, Estados Unidos.
- Seigel, R.A. e Ford, N.B. 1987. Reproductive ecology. In Seigel, R.A., Collins, J.T., e Novak, S.S. (eds.), *Snakes: ecology and evolutionary biology*, pp. 210-252. MacMillan Publishing Co, New York.
- Seigel, R.A. e Ford, N.B. 1991. Phenotypic plasticity in the reproductive characteristics of an oviparous snake, *Elaphe guttata*: implications for life history studies. *Herpetologica* 47:301-307.
- Shine, R., Olsson, M. M. e Mason, R. T. 2000. Chastity belts in gartersnakes: the functional significance of mating plugs. *Biological Journal of the Linnean Society* 70: 377-390.
- Shine, R. 1978. Sexual size dimorphism and male combat in snakes. *Oecologia* 33: 269-277.
- Shine, R. 1994. Sexual size dimorphism in Snakes revisited. *Copeia* 2: 325-346.
- Siegel, D.S., Miralles, A., Chabarria, R.E. e Aldridge, R.D. 2011. Female reproductive anatomy: cloaca, oviduct, and sperm storage. In R. D. Aldridge and D. M. Sever (Eds): *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*, pp. 347-409. CRC Press, Enfield, Estados Unidos
- Shine, R. 2003. Reproductive strategies in snakes. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: 995-1004.
- Shine, R. 1977a. Reproduction in Australian elapid snakes. I. Testicular cycles and mating seasons. *Australian Journal of Zoology* 25: 647-653.

- Shine, R. 1977b. Reproduction in Australian elapid snakes II. Female reproductive cycles. *Australian Journal of Zoology* 25: 655-666.
- Shine, R. 1980. Comparative ecology of three Australian snake species on the genus *Cacophis* (Serpentes: Elapidae). *Copeia* 1980: 1831-1838.
- Shine, R. 1982. Ecology of the Australian elapid snake *Echiopsis curta*. *Journal of Herpetology* 16: 388-393.
- Siegel, D. S. e Sever, D. M. 2006. Uterine-muscular twisting and sperm storage in viperids. *Herpetological Conservation & Biology* 1: 87-92.
- Sites Jr., J. W., Reeder, T. W. e Wiens, J.J. 2011. Phylogenetic Insights on Evolutionary Novelties in Lizards and Snakes: Sex, Birth, Bodies, Niches, and Venom. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 42:227-44.
- Silva, K.M.P., Sueiro, L.R., Galassi, G.G., Almeida-Santos, S.M. 2013. Reprodução de *Bothrops* spp. (Serpentes, Viperidae) em criadouro conservacionista. *Veterinária e Zootecnia* 20: 632-642.
- Silva, K. M. P. 2015. Biologia reprodutiva da jararaca da Amazônia, *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae). Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Silva, K.B., Zogno, M.A., Camillo, A.B., Pereira, R.J.G., Almeida-santos, S.M. 2015. Annual changes in seminal variables of golden lancehead pitvipers (*Bothrops insularis*) maintained in captivity. *Animal Reproduction Science* 136: 144-150.
- Solórzano, A. & Cerdas, L. 1988. Biología reproductiva de la cascabel centroamericana *Crotalus durissus durissus* (Serpentes: Viperidae) en Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 36: 221-226.
- Solórzano, A. e Cerdas, L. 1989. Reproductive biology and distribution of the terciopelo, *Bothrops asper* Garman (Serpentes: Viperidae), in Costa Rica. *Herpetologica* 45: 444-450.

Stille, B., Madsen, T. and Niklasson, M. 1986. Multiple paternity in the adder, *Vipera berus*. *Oikos* 47: 173-175.

The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on **26 May 2016**.

Travaglia-Cardoso, S. R. 2011. História natural das serpentes da região de Munhoz, sul de Minas Gerais, Serra da Mantiqueira. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil.

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

Wen, F. H., Monteiro, W. M., Silva, A. M. M., Tambourgi, D. V., Silva, I. M., Sampaio, V. S., Santos, M. C., Sachett, J., Ferreira, L. C. L., Kalil, J., Lacerda, M. 2015. Snakebites and scorpion stings in the Brazilian Amazon: Identifying research priorities for a largely neglected problem. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (5): e0003701. doi:10.1371/journal.pntd.0003701.

Werneck, F.P., Giugliano, L. G., Collevatti, R. G. e Colli, G. R. 2009. Phylogeny, biogeography and evolution of clutch size in South American lizards of the genus *Kentropyx* (Squamata: Teiidae). *Molecular Ecology* 18: 262–278.

Yamanouye, N., Silveira, P.F., Abdalla, F.M.F., Almeida-Santos, S.M., Breno, M.C., Salomão, M.G. 2004. Reproductive cycle of the Neotropical *Crotalus durissus terrificus*: II. Establishment and maintenance of the uterine muscular twisting, a strategy for long-term sperm storage. *General and Comparative Endocrinology* 139: 151-157.

Conclusões

- A inércia filogenética e as condições ambientais têm um papel na determinação dos eventos reprodutivos no gênero *Bothrops*.
- Os ciclos reprodutivos em machos e fêmeas de *Bothrops* são sazonais, embora haja variação intra e interespecífica em relação à época de ocorrência dos eventos reprodutivos.
- Fêmeas do gênero *Bothrops* podem apresentar estocagem de esperma tanto nos sulcos da junção útero-vaginal quanto no infundíbulo.
- Machos do gênero *Bothrops* podem estocar esperma no ducto deferente e também no epidídimo.
- Diversas espécies de *Bothrops* apresentam plug copulatório na vagina, embora ainda com função e tempo de permanência desconhecidos.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 30/11/2016

Verônica A. Barros

Assinatura do autor