



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

Erick Augusto Bassi

**Estratégias reprodutivas no gênero *Micrurus*  
(Serpentes, Elapidae)**

São José do Rio Preto  
2021

Erick Augusto Bassi

**Estratégias reprodutivas no gênero *Micrurus*  
(Serpentes, Elapidae)**

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.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Profa. Dra. Selma Maria de Almeida Santos  
Coorientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Classius de Oliveira

São José do Rio Preto  
2021

B321e Bassi, Erick Augusto  
Estratégias reprodutivas no gênero *Micrurus* (Serpentes, Elapidae) /  
Erick Augusto Bassi. -- São José do Rio Preto, 2021  
126 f. : il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio  
Preto

Orientadora: Selma Maria de Almeida-Santos  
Coorientador: Classius de Oliveira

1. Cobra venenosa. 2. Reprodução. 3. Espermatogênese. 4.  
Ovulação. 5. Receptáculo-estocagem. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.  
Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José  
do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## **Erick Augusto Bassi**

“Estratégias reprodutivas no gênero *Micrurus* (Serpentes, Elapidae)”

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.

Financiadora: CAPES

### **Comissão Examinadora**

Orientadora: Profa. Dra. Selma Maria de Almeida Santos  
Instituição: Instituto Butantan

Coorientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira  
Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/IBILCE)

Profa. Dra. Leticia Ruiz Sueiro  
Instituição: Universidade de Guarulhos (Univeritas – UNG)

Profa. Dra. Christine Strüssmann  
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso (UFMS)

Profa. Dra. Sonia Zanini Cechin  
Instituição: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Prof. Dr. Henrique Bartolomeu Pereira Braz  
Instituição: Instituto Butantan (IB)

São José do Rio Preto

06 de novembro de 2020

## AGRANDECIMENTOS

Esse é o momento do término de um ciclo, de uma caminhada que começou a 4-5 anos atrás. Houve muitos momentos difíceis nesse doutorado, em todos os sentidos, pessoalmente e academicamente. A pandemia e o distanciamento da família foram fatores que pesaram muito nesse processo. Por isso agradeço imensamente à Deus por me fortalecer nos momentos de tristeza e me confortar nas horas difíceis, permitindo a solidão ao invés da solidão.

A minha mãe Elizabeth, por ser meu porto seguro, por ter paciência com meu jeito explosivo, sempre me incentivando e trazendo alegria com as coisas simples da vida. Obrigado Mãe!!! por todo carinho, suporte nas minhas escolhas, na profissão que exerço, por telefonar perguntando se estou bem! Contando as novidades dos pets (Lili, Meg e Nilo), pelos pedidos para ser mais organizado e ter mais atenção nas coisas, e principalmente, por seus singelos atos de amor e afeto. Dedico a você mãe essa conquista! Te amo!

Ao meu Tio Valter por todo o suporte ao longo da minha carreira acadêmica, por acreditar em mim e por servir de exemplo na minha vida. Mostrando que em todas as áreas da vida, devemos realizar tudo com muito trabalho duro, perseverança e capricho, e assim, a gente chega lá! Muito obrigado por tudo Tio.

A minha orientadora Selma, por abrir as portas do laboratório, agradeço muito por me orientar desde a iniciação científica (graduação), mestrado e doutorado, conduzimos juntos todas as descobertas e acredito que vão gerar bons frutos. Obrigado professora! pela amizade, pela confiança no meu trabalho como pesquisador, por me colocar nos trilhos mesmo quando o desânimo aparecia. Não posso esquecer de toda paciência nas inúmeras reuniões, para discutirmos os artigos e o capítulo do livro, mas que geraram bons frutos. Sou grato pelos conselhos, por ser um exemplo como pesquisadora, e por me convencer a aceitar a dar aula na UNESP (como professor substituto), com toda certeza foi uma das melhores sensações que tive na pós-graduação. E principalmente, por transmitir todo encanto e deslumbramento pelas descobertas nas cobras corais, que convenhamos... são muito mais legais que os viperídeos rs.

Agradeço imensamente ao professor Classius, por me coorientar no doutorado, por disponibilizar toda a estrutura do laboratório de Anatomia comparada, pela ajuda e suporte desde o ingresso na pós-graduação em Biologia Animal. Obrigado! Apreendi muito contigo, na monitoria que realizei em sua disciplina, de anatomia humana e comparada, na regência e condução como professor, reinventando-se em cada aula com uma nova didática, sou grato pelos ensinamentos! E o tenho como exemplo também como pesquisador “*Lab head*” ético, íntegro, conseguindo sempre criar um ambiente legal e acolhedor no laboratório. Sou grato pela oportunidade de ter sido seu orientado!

Aos amigos de Rio Preto, que se tornaram uma família ao longo dessa caminhada, morando na mesma república: Lucas, Mônica, Ferzinha, Nego, Maurício, Vagner, Ferzona, Edmar e Fabrício. Aos amigos Madá, Dorigão, Larinha e Ivã, já sinto saudade de todos vocês!! Obrigado pela amizade, bons momentos de risadas, companheirismo, inúmeros conselhos e pelas lindas lembranças, que guardarei com carinho pelo resto da minha vida.

A Tatiane (Xu/Musa) por ter entrado na minha vida, pelo carinho, pelas risadas, pelos sorrisos e por todos os momentos felizes que poderiam durar a eternidade, e ainda assim, faltaria tempo eheheh obrigado! Você foi uma luz na minha vida :)

Aos amigos queridos do laboratório de anatomia, Larinha (novamente hihihi), Lara, Wadson, Ariane, Bruno, Gabriel e logicamente, não poderia esquecer da CHEFE! a Maysa, que sempre acaba sendo a “nossa Senhora desatadora dos nós”. Obrigado a todos! Pelas risadas, brincadeiras, sorrisos, por todo o carinho, pelas conversas e desabafos sobre a pós-graduação e os inúmeros debates dos momentos que estamos vivendo no país. Vou guardar todos vocês com muito carinho! Obrigado em especial a Érica e Wadson pela ajuda com algumas medições.

Ao professor Sebastião Taboga e ao técnico Luiz Falleiros pela ajuda e suporte no Laboratório Multiusuário.

Aos companheiros de handebol da Unesp de Rio Preto pelo aprendizado e pelas conquistas, dentro e fora de quadra. Aos alunos que ministrei a disciplina de Zoologia dos Vertebrados, muito obrigado! Vocês foram demais. Esse foi um grande desafio e com certeza, foi uma das experiências mais alegradoras que tive, espero que este, seja o meu caminho! :)

As os curadores das coleções biológicas, que possibilitaram essa pesquisa, Paulo Manzani, Sônia Cechin, Paulo Passos, Felipe Graziottin, Moisés de Souza, Ana Prudente, Glauca Pontes, Maria Rita, Gustavo Graciolli, Richard Vogt, Pedro Nunes, Roberto Baptista de Oliveira, Luciana Barretos e Moisés Barbosa.

A Thaís Guedes e ao Henrique Braz por disponibilizarem o material tecidual dos espécimes de *M. ibiboboca* da coleção da UFPB.

Aos amigos do Grupo de Reprodução Squamata, sou grato pela troca de ideias e crescimento dentro do Lab. Agradeço em especial, Rafaela, Eletra, Serena e Tati.

A minha amiga e ilustradora científica Thaís Lopes Hepal, pelo desenho sensacional!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigado a todos, sou grato!



(Fonte, ilustração: Thaís Lopes Hepal)

*“Homenagem a todas as cobras corais que foram coletadas na natureza e usadas nessa pesquisa! Ou mortas pela ignorância humana. Que o presente estudo, possa contribuir com dados para sua proteção, conservação no campo, jogando luz a sua beleza e importância ao ecossistema”.*

*Obrigado!*

*Att. Bassi*

*“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores,  
Se não houver flores, valeu a sombra que as folhas proporcionaram,  
Se não houver folhas, valeu a intenção da semente”*

(Ceolin, 2000)

## RESUMO

No Brasil existem basicamente duas linhagens de espécies de coral-verdadeira, conforme o padrão de coloração, grupo de anéis pretos padronizados em mônades (BRM) e o grupo de anéis pretos em tríades (BRT). As espécies de cobra coral estão distribuídas em diversos biomas e conseqüentemente estão expostas a diferentes condições climáticas. Existe a hipótese que em alguns grupos de serpentes ocorra uma forte conservação ancestral das estratégias reprodutivas, mesmo que as espécies deste grupo estejam em regiões climaticamente diferentes. Entretanto, outros trabalhos apontam que as espécies ectotérmicas podem ser fortemente influenciadas pelas condições climáticas, ou seja, estas iriam alterar as condições morfofisiológicas e reprodutivas, conforme as condições ambientais existentes no meio. Desta forma, o propósito deste trabalho foi investigar as diferenças nas estratégias reprodutivas existentes no gênero *Micrurus*, nas linhagens BRM e BRT, comparando espécies distribuídas em diferentes biomas e ao mesmo tempo, próximas filogeneticamente. Para tanto, foram analisados os ciclos reprodutivos de machos e fêmeas, os períodos de ocorrência dos eventos reprodutivos (e.g., espermatogênese, hipertrofia do segmento sexual renal, vitelogênese, oviposição e maturidade sexual) e as estratégias reprodutivas existentes em cada espécie. Análises histológicas e histoquímicas foram empregadas para avaliar a existência da estratégia de estocagem dos espermatozoides (machos e fêmeas), o período da espermatogênese, atividade do SSK e natureza histoquímica das secreções do oviduto. Averiguando assim, com uma abordagem comparativa, a hipótese da conservação dos padrões reprodutivos independente das condições climáticas, ou de haver a influência climática atuando no ciclo reprodutivo das corais-verdadeiras.

*Palavras-chave:* Cobra venenosa. Reprodução. Espermatogênese. Ovulação. Receptáculos-estocagem.

## ABSTRACT

Brazilian coral snakes group have two lineages with different color patterns, black rings arranged in monads (BRM) and species with the black rings in triads (BRT). Species of coral snakes are distributed in different biomes with different kind of climate conditions. There is a hypothesis that some groups possess a solid conservation of reproductive pattern, even though the species are distributed in climatically different regions. Meanwhile, another research indicate that ectothermic species could be influenced by climate conditions, that is, changing their morphophysiological and reproductive conditions according to environmental variables. Therefore, the aim of this search was analyze the difference of reproductive strategies in genus *Micrurus*, comparing species of BRM and BRT distributed in distinct biome, and the same time phylogenetic close. Thus, we analyzed the reproductive cycle of males and females, delimiting the period of occurrence of the reproductive events (e.g., spermatogenic, hypertrophy of the sexual segment of kidney (SSK), vitellogenesis, oviposition and sexual maturity), and the reproductive strategies present in each species. Histological and histochemical analyzes were used to evaluate the existence of the sperm storage strategy (male and female), the period of spermatogenesis, histochemical nature of oviduct secretions. Thus, investigating the hypothesis that the species are conserving reproductive patterns regardless of climatic conditions, or there would be no pattern and the species present a diversity of reproductive cycles being directly influenced by climatic conditions.

**Keywords:** Venomous snakes. Reproduction. Spermatogenesis. Ovulation. Sperm-storage

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	10
<b>2. ARTIGO I - Estratégias e ciclo reprodutivo dos machos em espécies do gênero <i>Micrurus</i></b> .....	19
<b>Resumo</b> .....	20
<b>1 Introdução</b> .....	21
<b>2 Material e métodos</b> .....	24
<b>2.1 Espécies e espécimes analisados</b> .....	24
<b>2.2 Área de distribuição dos espécimes</b> .....	25
<b>2.3 Dados macroscópicos</b> .....	26
<b>2.4 Histologia e histoquímica</b> .....	27
<b>2.5 Morfometria</b> .....	28
<b>2.6 Estratégias reprodutivas analisadas</b> .....	29
<b>2.7 Maturidade sexual</b> .....	30
<b>2.8 Estatística</b> .....	30
<b>3 Resultados</b> .....	31
<b>3.1 Ciclo reprodutivo em <i>Micrurus corallinus</i></b> .....	31
<b>3.2 Ciclo reprodutivo em <i>Micrurus frontalis</i></b> .....	32
<b>3.3 Ciclo reprodutivo em <i>Micrurus altirostris</i></b> .....	34
<b>3.4 Ciclo reprodutivo em <i>Micrurus surinamensis</i></b> .....	35
<b>3.5 Ciclo reprodutivo em <i>Micrurus ibiboboca</i></b> .....	36
<b>3.6 Ciclo reprodutivo em <i>Micrurus paraenses</i></b> .....	38
<b>3.7 Comparativo do potencial reprodutivo</b> .....	41
<b>3.8 Maturidade sexual</b> .....	41
<b>4 Discussão</b> .....	52
<b>4.1 Maturidade sexual</b> .....	58
<b>4.2 Conclusão</b> .....	59
<b>Referências</b> .....	61
<b>3. ARTIGO II – Estratégias e ciclo reprodutivo das fêmeas em espécies do gênero <i>Micrurus</i></b> .....	65
<b>Resumo</b> .....	66
<b>1 Introdução</b> .....	67
<b>2 Material e métodos</b> .....	69
<b>2.1 Espécies e espécimes analisados</b> .....	69
<b>2.2 Ciclo reprodutivo</b> .....	70
<b>2.3 Área de distribuição das espécies</b> .....	71
<b>2.4 Biometria</b> .....	72
<b>2.5 Histologia</b> .....	73
<b>2.6 Histoquímica</b> .....	73
<b>2.7 Maturidade sexual</b> .....	74
<b>2.8 Morfometria glandular</b> .....	74
<b>2.9 Estratégias reprodutivas analisadas</b> .....	74
<b>3 Resultados</b> .....	75
<b>3.1 Ciclo reprodutivo</b> .....	75
<b>3.2 Estocagem de espermatozoides e espermatozoides no lúmen</b> .....	83
<b>3.3 Maturidade sexual</b> .....	84
<b>3.4 Histoquímica</b> .....	86

<b>4 Discussão.....</b>	<b>100</b>
<b>4.1 Ciclos reprodutivos.....</b>	<b>100</b>
<b>4.2 Estratégia de estocagem dos espermatozoides.....</b>	<b>108</b>
<b>4.3 Conclusão.....</b>	<b>112</b>
<b>Referências.....</b>	<b>114</b>
<b>4. CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>119</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>121</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Na evolução da ordem Squamata, diferentes pressões seletivas, somadas à ampla diversidade de ambientes (e.g., condições de umidade, pluviosidade, amplitude térmica), proporcionaram condições para o aparecimento de modificações morfofisiológicas, que nos animais ectotérmicos, resultaram em novas adaptações estratégicas para competição, busca por alimento, disputa por território e melhoria no sucesso reprodutivo (Pough, 1980; Seigel and Ford, 1987; Vitt and Caldwell, 2009).

As serpentes e os lagartos possuem ampla distribuição no planeta, conquistaram a sobrevivência em diferentes ambientes e biomas; regiões desérticas com grande amplitude térmica e baixa umidade, florestas tropicais úmidas com sazonalidade das chuvas, e regiões insulares (ilhas) com limitação de água e comida (Greene, 1997; Campbell and Lamar, 2004). Dentro desta dispersão, temos a radiação de espécies adaptadas a diferentes modos de vida, marinho, terrestre, fossorial, arborícola e semi-aquático (água-doce) (Angelini and Ghiara, 1984; Vitt and Caldwell, 2009). Da mesma forma que ao longo da evolução houveram diferentes modificações anatômicas para uma melhor adaptação ao ambiente, estruturas reprodutivas também passaram por um aumento de especialização e complexidade (Fox, 1977; Blackburn, 1998; Holt and Fazeli, 2016), diferentes famílias tiveram estratégias reprodutivas selecionadas, conseqüentemente isso ampliou a forma de potencializar o sucesso reprodutivo para cada grupo (Shine, 2003).

Os estudos com reprodução de serpentes, em seu histórico mais antigo, estão intimamente interligados com pesquisas de história natural e pesquisas com animais em cativeiro (Pizzatto, Almeida-Santos, and Marques, 2007). Os trabalhos taxonômicos e de levantamento de fauna no Brasil possuem grande importância, pela grande riqueza de dados ambientais sobre as espécies, dados de comportamento, padrão de atividade, distribuição, dieta e eventualmente existem informações anedóticas (pontuais) sobre dados reprodutivos, como número de ovos (tamanho da ninhada), locais de oviposição, e o período de ocorrência

destes eventos (Cunha and Nascimento, 1978; Roze, 1996; Greene, 1997; Campbell and Lamar, 2004). Entretanto, ao longo do tempo, diversas questões ligadas à reprodução (e.g., comportamento de combate/cortejo da fêmea, período de cópula, cuidado parental, relação tamanho da fêmea com número de filhotes) foram levantadas, criando então a necessidade de linhas de pesquisa direcionadas especificamente a aspectos reprodutivos.

Durante muitos anos, a maior porcentagem dos trabalhos existente sobre biologia reprodutiva, era de espécies de regiões temperadas (Seigel and Ford, 1987; Greene, 1997; Pizzatto, Almeida-Santos, and Marques, 2007). Entretanto, a partir da década de 80 e 90, estudos com espécies neotropicais ganharam espaço, devido à grande biodiversidade e singularidade ambiental, que difere dos padrões ambientais das regiões temperadas, com as estações do ano bem definidas (Mathies, 2011). Como a maioria das teorias evolutivas relacionadas a caracteres reprodutivos ainda utilizam como base espécies de regiões temperadas (Aldridge et al., 2020) existe então a necessidade de uma ampliação de trabalhos com espécies neotropicais, aprofundando questões básicas de anatomia comparada, caracteres comportamentais, ciclo reprodutivo e biologia estrutural. De forma a possibilitar uma melhor compreensão da história evolutiva das linhagens existentes no novo mundo.

O ciclo reprodutivo nas serpentes, pode ser compreendido e analisado em diferentes “escalas”, como: individual, para análise da variação na gametogênese; populacional, para verificação de sincronia entre os indivíduos (Girons, 1982; Mathies, 2011); e evolutiva, no qual o dado reprodutivo é comparado e entre espécies para a verificação de padrões reprodutivos (Aldridge et al., 2020). Diversos eventos ligados à reprodução compõem o ciclo reprodutivo das serpentes, como: a espermatogênese, período de hipertrofia do segmento sexual renal, período de estocagem de espermatozoides, vitelogênese/ovulação, período de cópula, parturição ou oviposição, e eclosão dos filhotes (Almeida-Santos et al., 2014).

As estratégias reprodutivas são modificações adaptativas que o indivíduo (ou

população) adota frente a uma condição do meio, relacionando-se diretamente ao balanço de investimento energético para reprodução, alteração do potencial reprodutivo e duração do tempo despendido na “tática” (Angelini and Ghiara, 1984). As estratégias reprodutivas nas serpentes compreendem uma diversidade de características ou mecanismos, morfofisiológicos, comportamentais e estruturais que possibilitam uma melhora (ou vantagem) no sucesso reprodutivo, e conseqüentemente na perpetuação da espécie (Shine, 2003; Clark et al., 2014). Dentro das estratégias reprodutivas, estruturas especializadas são proporcionam vantagens funcionais na reprodução, como: a torção muscular uterina “UMT” (Almeida-Santos and Salomão, 1997, 2002), plug copulatório (Friesen et al., 2013; Barros, Rojas, and Almeida-Santos, 2017) e receptáculo de estocagem de espermatozoides (Fox, 1956; Sever and Hamlett, 2002; Siegel et al., 2011a; Rojas, Barros, and Almeida-Santos, 2015; Holt and Fazeli, 2016).

As estratégias e os dados reprodutivos tem sido utilizados na otimização de análises filogenéticas, como: viviparidade (Shine, 1987; Blackburn and Stewart, 2011; Braz, Scartozzoni, and Almeida-Santos, 2016), partenogênese (Booth and Schuett, 2011; Sites et al., 2011), cuidado parental (Stahlschmidt and DeNardo, 2011), dimorfismo sexual (Shine, 1994; Rivas and Burghardt, 2001), formação da estrutura da *ampulla* (estocagem de espermatozoides nas vias seminíferas) (Siegel et al., 2011b) e locais de estocagem de espermatozoides no oviduto (Almeida-Santos and Salomão, 2002; Sever and Hamlett, 2002; Eckstut et al., 2009; Holt and Fazeli, 2016).

A grande maioria das espécies tropicais apresentam ciclo reprodutivo sazonal (Marques, 1996; Almeida-Santos and Salomão, 2002; De Resende and Nascimento, 2015; Silva et al., 2020). Uma explicação possível das espécies tropicais terem o ciclo reprodutivo sazonal, em um ambiente com altas temperaturas e com grande oferta de alimento, seria devido a um padrão ancestral conservado filogeneticamente em algumas linhagens de

serpentes (James and Shine, 1985; Brown and Shine, 2006). Almeida-Santos e Salomão (2002) analisando as estratégias reprodutivas dos viperídeos, com ênfase no gênero *Bothrops*, propuseram a hipótese que neste clado, há uma conservação dos padrões reprodutivos ancestrais, porque diversas espécies exibem praticamente os mesmos períodos de ocorrência dos eventos reprodutivos (i.e., corte, acasalamento, combate, período de estocagem, vitelogênese e nascimento dos filhotes), independente do hábitat (regiões temperadas e tropicais) e das diferenças climáticas existentes.

As regiões tropicais e subtropicais diferem do padrão climático das áreas temperadas, principalmente com relação a amplitude térmica e distribuição das chuvas ao longo do ano (Seigel and Ford, 1987). Diversas regiões no sul do Brasil, apresentam no inverno temperaturas abaixo de zero e ocorrência de geadas (Mendonça and Danni-Oliveira, 2007). A variação da temperatura corporal nos animais ectotérmicos, altera diretamente a sua condição ecofisiológica (Angilletta Jr., Niewiarowski, and Navas, 2002). As alterações da temperatura corpórea nas serpentes, podem interferir na performance de locomoção, forrageamento, digestão e reprodução (Brown and Shine, 2002; Marques, Almeida-Santos, and Rodrigues, 2006). Desta forma, as diferentes variações no clima (e.g., temperatura máxima, mínima e índice pluviométrico), em cada região, podem gerar novos padrões de ciclos reprodutivos nas espécies (Marques, Almeida-Santos, and Rodrigues, 2006; Mathies, 2011).

As serpentes tropicais servem como bons modelos para análise da plasticidade reprodutiva (Santos et al., 2005), além de possibilitar a averiguação das estratégias reprodutivas existentes e o quanto as condições climáticas podem influenciar na reprodução (Pizzatto and Marques, 2006; Barros, Rojas, and Almeida-Santos, 2014a). Nas últimas duas décadas, houve um aumento significativo de trabalhos sobre reprodução de serpentes neotropicais, como nos grupos: Viperidae (Almeida-Santos and Salomão, 2002; Yamanouye et al., 2004; Alves, Argôlo, and Carvalho, 2014; Barros, Rojas, and Almeida-Santos, 2014b,

2014a; Silva et al., 2019, 2020); Dipsadidae (Rojas, Barros, and Almeida-Santos, 2013; De Resende and Nascimento, 2015; Loebens et al., 2016, 2017; Loebens, Almeida-Santos, and Cechin, 2020). Para a família Elapidae, os dados reprodutivos integrando análise macroscópica com histologia são escassos na literatura. Recentemente, Bassi et al. (2019) apresentaram novos dados sobre estratégias reprodutivas em *Micrurus corallinus* e *M. frontalis*. Porém, para melhor compreensão da evolução das estratégias reprodutivas, no gênero, existe a necessidade de análises em outras espécies.

A família Elapidae é representada nas Américas pelas cobras corais verdadeiras, que são compostas por três gêneros: *Micruroides*, *Leptomicrurus* e *Micrurus* (Slowinski, 1995; Roze, 1996). No Brasil ocorrem apenas os gêneros *Leptomicrurus* com três espécies na Amazônia (Campbell and Lamar, 2004; Bernarde, 2011) e *Micrurus* com 36 espécies distribuídas pelo território brasileiro, no qual sete destas são endêmicas (Costa and Bérnils, 2018). As espécies do gênero *Micrurus* não são abundantes na natureza e possuem hábito semi-fossorial (Silva Jr., Buononato, and Feitosa, 2016), isso dificulta a sua observação durante a coleta no campo. Assim, as coleções biológicas apresentam-se como fonte alternativa de dados, possibilitando estudos anatômicos, reprodutivos e taxonômicos (Pizzatto, Almeida-Santos, and Marques, 2007; Almeida-Santos et al., 2014). Existem espécies de corais verdadeiras distribuídas em diversos biomas no Brasil (Campbell and Lamar, 2004), tais como: *Micrurus corallinus*, *M. frontalis*, *M. altirostris*, *M. surinamensis*, *M. ibiboboca* e *M. paraensis*. Essas espécies ocorrem em regiões com diferentes características fitogeográficas e condições climáticas (Tab.1), e possuem um número considerável de exemplares depositados em coleções biológicas.

Tabela 1. – Espécies de corais verdadeiras e características climáticas dos biomas de ocorrência. Com os respectivos dados de médias anuais de temperatura, pluviosidade e duração de estiagem. Dados climáticos conforme o mapa de classificação climática Köppen's para o Brasil, Alvares et al. (2013).

Espécie	Linhagem	Bioma	Média de pluviosidade (mm)	Média de temperatura (°C)	Estiagem (meses)
<i>Micrurus surinamensis</i>	BRT	Amazônia	1900 - >3100	22 - >26	até 3
<i>Micrurus paraensis</i>	BRM	Amazônia	1900 - >3100	22 - >26	até 3
<i>Micrurus ibiboboca</i>	BRT	Caatinga	700 - 1600	>27 °C	6 - 8
<i>Micrurus frontalis</i>	BRT	Cerrado	1300 - 1900	20 - 26	4-5
<i>Micrurus corallinus</i>	BRM	Mata Atlântica	1000 - 2200	14 - 22	3-5
<i>Micrurus altirostris</i>	BRT	Pampa	1300 - 2200	12 - 22	3-4

(Fonte: produção do autor).

A espécie *Micrurus corallinus* possui ampla distribuição no bioma Mata Atlântica, do sul da Bahia ao estado do Rio Grande do Sul (Marques, 1996; Campbell and Lamar, 2004). O conjunto fitogeográfico da Mata Atlântica exhibe diferenças de temperatura e umidade, da região litorânea ao interior do continente. Enquanto, as regiões sudeste-sul são dotadas de clima mesotérmico, com médias anuais de 18 a 22 °C de temperatura e 1300 a 1600 mm chuva, ocorrendo curtos períodos de estiagem entre o outono e o inverno (Ab'Sáber, 2007). Na porção Sul do país temos a distribuição da espécie *M. altirostris*, abrangendo o bioma do Pampa e a porção sul da Mata Atlântica (Nogueira et al., 2019). Dentre as características que diferem o Sul do país, temos uma topografia que apresenta regiões com elevada altitude, homogeneidade na distribuição das chuvas ao longo do ano (1250 -2000 mm), ocorrência de geadas e temperaturas abaixo de zero no inverno (Mendonça and Danni-Oliveira, 2007).

No bioma Amazônia temos a presença das espécies *M. paraensis* e *M. surinamensis* (Nogueira et al., 2019). Esta região possui um intenso regime pluviométrico com a média anual de chuvas de 2145 mm e um curto período de seca no inverno. Entretanto, há uma homogeneidade térmica ao longo do ano, com temperatura média de 28,2°C (Mendonça and Danni-Oliveira, 2007).

A espécie *M. frontalis* possui a distribuição no bioma Cerrado, e ecótono Cerrado-Mata Atlântica (Nogueira et al., 2019), o bioma Cerrado possui alta sazonalidade no regime de

chuvas, com cinco meses de estiagem e sete meses com maior pluviosidade (Ab'Sáber, 2007). Além disso, possui baixa amplitude térmica ao longo do ano, com regiões apresentando temperatura média 25,6 °C (e.g., Cuiabá) (Mendonça and Danni-Oliveira, 2007). A espécie *M. ibiboboca* apresenta-se distribuída no bioma Caatinga (Silva Jr., Buononato, and Feitosa, 2016). Este bioma pode apresentar sete a oito meses secos, sendo classificado como semiárido, exibe baixa amplitude térmica ao longo do ano, com médias acima de 28°C e máximas de 37° C (Mendonça and Danni-Oliveira, 2007).

No gênero *Micrurus* existem duas linhagens filogenéticas diferentes (Figura 1), conforme o padrão de coloração (cujas diferenças são suportadas por caracteres morfológicos e moleculares). O grupo de espécies que apresentam anéis pretos em mônades (BRM), a exemplo de *M. corallinus* e *M. paraenses*. E outro grupo que apresenta anéis pretos agrupados em tríades (BRT), como observado em *M. frontalis*, *M. Altirostris*, *M. surinamensis* e *M. ibiboboca*. (Slowinski, 1995; Campbell and Lamar, 2004).

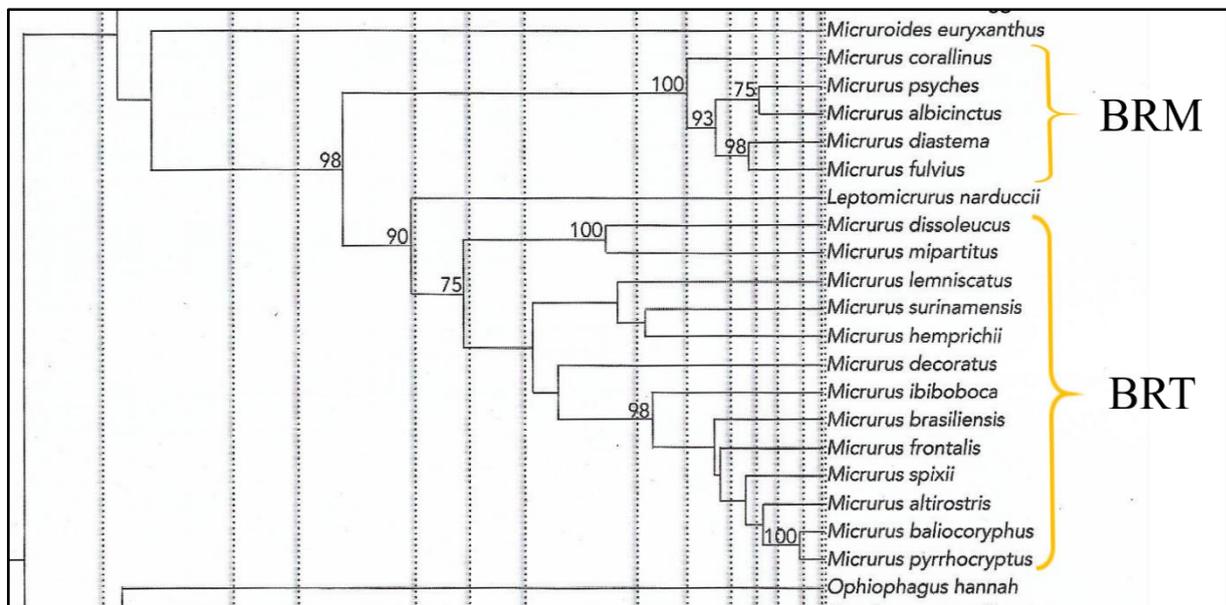


Figura 1. Proposta de filogenia da família Elapidae, trecho do grupo *Micrurus*, adaptado Zaher et al. (2016). **BRM**: grupo de espécies com anéis pretos organizados em mônades; **BRT**: grupo de espécies com anéis pretos arranjados em tríades.

Marques et al. (2013) constataram diferenças de estratégias reprodutivas entre as

linhagens BRM e BRT, em relação: a presença do comportamento de combate entre os machos, dimorfismo sexual e época do ciclo reprodutivo. O comportamento de combate entre machos foi constatado em algumas espécies de tríades, como: *M. altirostris* (Almeida-Santos, De Aguiar, and Balestrin, 1998), *M. frontalis* (Almeida-Santos, Coeti, and Bassi, 2021) e recentemente em *M. ibiboboca* (Coeti e Almeida-Santos, dados não publicados). A hipótese é que a presença do comportamento de combate, teria levado a seleção de machos com maior comprimento rostro-cloacal, pois estes teriam maiores chances de ganhar o combate, copular com a fêmea e deixar descendentes (Shine, 1994; Marques et al., 2013).

Marques et al. (2013) observaram que nas espécies mônades, não há o comportamento de combate, as fêmeas são maiores que os machos (dimorfismo sexual) e a espermatogênese coincide com a época de acasalamento. Enquanto, para as espécies tríades os machos são maiores que as fêmeas, e por não coincidir a época de cópula com a ovulação, nesse grupo haveria a estocagem de espermatozoides nas fêmeas (hipótese). Desta forma, esta pesquisa tem como proposta investigar as estratégias reprodutivas em espécies de ambos os clados (BRM e BRT), investigando a hipótese da existência de padrões reprodutivos conservados nas espécies do grupo *Micrurus*. Para tanto, os seguintes temas serão abordados: i - Tipo de ciclo da fêmea (curto ou de longa duração); ii - Tipo de ciclo do macho (curto ou de longa duração); iii – período de ocorrência dos eventos reprodutivos; iv – análise das estratégias reprodutivas.

A tese foi dividida em dois capítulos, no primeiro capítulo apresentamos uma análise dos eventos reprodutivos que ocorrem nos machos das seis espécies de cobras corais, e de forma comparativa, a caracterização das estratégias reprodutivas de cada espécie.

No segundo capítulo apresentamos uma análise do ciclo reprodutivo das fêmeas das quatro espécies do gênero *Micrurus*, e das estratégias reprodutivas adotadas por essas espécies. Os dados das fêmeas de *Micrurus corallinus* e *M. frontalis*, referentes ao capítulo 2, já estão publicados na revista *Amphibia-Reptilia*, por isso não estão presentes no manuscrito.

## OBJETIVO

O objetivo desta tese foi investigar as estratégias reprodutivas existentes nas duas linhagens de cobras corais do gênero *Micrurus*, utilizando uma abordagem comparativa. Pretende-se defender a tese que existe um padrão de estratégias reprodutivas conservados em cada linhagem. Para tanto, serão abordadas as seguintes questões:

- 1) Espécies filogeneticamente próximas manteriam as estratégias reprodutivas em ambientes (biomas) climaticamente diferentes?
- 2) Haveria um padrão reprodutivo conservado filogeneticamente, direcionando o período de ocorrência dos eventos reprodutivos?
- 3) As espécies localizadas em regiões com curto período chuvoso ou com o frio marcante do inverno apresentariam um ciclo reprodutivo de curta duração? Em regiões com baixa amplitude térmica e chuvas bem distribuídas ao longo do ano, as espécies apresentariam ciclo reprodutivo extenso?
- 4) A estocagem de espermatozoides ocorre em diferentes espécies do grupo? As espécies de *Micrurus* possuem os mesmos locais de estocagem no oviduto? A estocagem seria de curta ou de longa duração?
- 5) A estratégia de estocagem dos espermatozoides acontece nos machos? A estrutura da *ampulla* ocorre nas espécies do grupo?

## 2. ARTIGO I

### Estratégias e ciclo reprodutivo dos machos em espécies do gênero *Micrurus*

**Erick Augusto Bassi<sup>1,2,3,\*</sup>, Classius De Oliveira<sup>2,3</sup>, Selma Maria de Almeida-Santos<sup>1,3</sup>**

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

2- Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Departamento de Biologia, Campus São José do Rio Preto, 2265, Rua Cristóvão Colombo, 15054-000, SP, Brasil.

3- Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Campus São José do Rio Preto, SP, Brasil.

\*Corresponding author: Erick Augusto Bassi; Postal address: Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, Brasil. E-mail address: erick.bassi@unesp.br; Phone number (+55) 11 3384-7727.

## RESUMO

As cobras corais verdadeiras do gênero *Micrurus* estão distribuídas em diferentes biomas no Brasil. Esse grupo apresenta a linhagem das espécies com padrão de coloração de anéis pretos em mônades (BRM) e o grupo com padrão de anéis pretos em tríades (BRT). Essas linhagens apresentaram variações de estratégias reprodutivas, relacionados ao padrão de ciclo reprodutivo, atividade do SSK e de estocagem de espermatozoides no ducto deferente. As espécies clado BRM, *M. corallinus* e *M. paraensis* exibiram o padrão de ciclo espermatogênico descontínuo (curto), e na classificação populacional, o ciclo reprodutivo é sazonal semi-sincronizado. Apesar da duração da espermiogênese ser de apenas 6 meses, as espécies mônades exibem intensa produção de espermatozoides pelos túbulos seminíferos nesse período, sendo evidenciado pelas maiores médias comparativas de GSI, volume relativo do testículo entre as espécies, e pela presença da estocagem de espermatozoides de elevado armazenamento no ducto deferente. As espécies da linhagem BRT exibiram dois padrões de ciclo espermatogênico: o contínuo (*M. frontalis* e *M. surinamensis*) e descontínuo (*M. ibiboboca* e *M. altirostris*). O período de hipertrofia do SSK coincidiu com a extensão da espermiogênese, no ducto deferente não houve variação na concentração de espermatozoides entre as estações, mesmo nas espécies *M. altirostris* e *M. ibiboboca* que exibem a estratégia de estocagem. A maturidade sexual é alcançada com menores medidas de Crc no clado BRM, apenas os machos de *M. altirostris* e *M. ibiboboca* (BRT) apresentam maturidade com Crc abaixo de 500 mm. As espécies do clado BRM apresentaram o padrão de estratégias reprodutivas conservado, sendo evidenciado pela análise comparativa de espécies em diferentes biomas, que mostram sincronia no período de ocorrência dos eventos reprodutivos. Enquanto no grupo BRT há uma variação das estratégias reprodutivas, indicado pelas diferenças nos eventos reprodutivos, possivelmente pela influência do ambiente nesse grupo.

*Palavras-chave:* Elapidae, ciclo-dissociado, ciclo associado.

## 1 - INTRODUÇÃO

Nas serpentes a atividade reprodutiva dos machos pode ser analisada com base em diferentes parâmetros, como: ciclo espermatogênico (Goldberg and Parker, 1975), nível de testosterona (Graham et al., 2008), atividade das células de Leydig (Seigel and Ford, 1987) e pelas variações do Segmento Sexual Renal (SSK) ao longo do ano (Rojas, Barros, and Almeida-Santos, 2013; Loebens et al., 2016). Os níveis de testosterona aumentam em um período que antecede o início espermiogênese (Fox, 1977). Algumas espécies exibem um aumento volumétrico do testículo no período de maior atividade espermatogênica, e na ocorrência de uma diminuição da produção de espermatozoides, pode haver um decréscimo do índice gonadossomático e do volume testicular, como observado em *Micrurus tener* (Quinn, 1979).

Durante muitos anos, a análise do ciclo reprodutivo de diversas espécies de serpentes neotropicais foram feitas com base apenas em dados biométricos, sendo está uma metodologia indireta de análise, pode haver equívocos na caracterização do ciclo espermatogênico, caso não haja uma confirmação histológica (Mathies, 2011). O ciclo reprodutivo de *Dipsas mikanii* foi inicialmente descrito por Pizzatto et al. (2008), apenas com dados biométricos, sendo sugerido pelos autores que a espermatogênese era contínua ao longo do ano. Posteriormente Rojas et al. (2013) realizaram uma nova avaliação do ciclo reprodutivo nessa espécie, adicionando abordagem histológica e histoquímica, verificou que havia uma redução da atividade espermatogênica ao longo do ciclo, diferenças na densidade das espermátides e no período de maturação dos espermatozoides. Desta forma, a histologia é uma ferramenta imprescindível para uma análise precisa do ciclo reprodutivo (Almeida-Santos et al., 2014).

Diversas espécies de serpentes apresentam ciclo espermatogênico sazonal e dissociado ao período de acasalamento (Almeida-Santos et al., 2004; Sever, 2004; Rojas et al., 2013). Neste caso, os machos podem exibir a estratégia de estocam dos espermatozoides na região

distal do ducto deferente. Desta forma, havendo a estocagem é possível evidenciar aumento significativo no diâmetro do ducto, como constatado em *Micrurus corallinus* (Almeida-Santos et al., 2004).

O ducto deferente pode exibir variações morfológicas e funcionais na região distal, e em algumas espécies, a porção distal do ducto apresenta a estrutura da *ampulla* (ou ampola) (Sever, 2004). Estrutura que pode apresentar diferentes graus de complexidade, pela variação na arquitetura do epitélio, formação criptas, atividade fagocítica e possível atividade secretiva pela liberação de material rico em carboidrato (Akbarsha et al., 2005). A presença da *ampulla* foi descrita em diversas espécies da América do Norte, como: *Seminatrix pygaea* (Sever, 2004), *Agkistrodon piscivorus* (Siegel et al., 2009b), *Coluber constrictor priapus*, *Tantilla gracilis* e *Virginia striatula* (Trauth and Sever, 2011b). E em espécies neotropicais, como: *Dipsas mikanii* (Rojas et al., 2013), *Bothrops erythromelas* (Barros, Rojas, and Almeida-Santos, 2014) e *Bothrops leucurus* (Barros, Rojas, and Almeida-Santos, 2014a). Nas espécies do gênero *Micrurus*, ainda não foram documentados a presença da estrutura da *ampulla*. Porém, a ausência da estrutura da *ampulla* não necessariamente excluiria a possibilidade dos machos realizarem a estocagem de espermatozoides (Bassi, 2016),

O segmento sexual renal (SSK) corresponde a uma modificação do túbulo contorcido distal (unidade renal, néfron), nos machos do grupo Squamata, esta região especializada exibe um processo de hipertrofia e passa a exercer um atividade secretora (Aldridge et al., 2011). O SSK apresenta uma resposta andrógeno-dependente e pode ser considerada uma característica sexual secundária (Krohmer et al., 2004). Ou seja, concomitante ao processo de espermatogênese, temos a hipertrofia do epitélio do SSK e, consecutivamente, a liberação de grânulos de secreção (Sever et al., 2008; Rojas et al., 2013). Desta forma, o SSK é uma das estruturas analisadas para compor ciclo reprodutivo dos machos do grupo Squamata. Os grânulos liberados pelos SSK podem apresentar diferentes funcionalidades no grupo das

serpentes, como a participação na produção de feromônio e a de aumentar a sobrevivência dos espermatozoides (Sever et al., 2008; Aldridge et al., 2011; Gist, 2011).

As cobras corais verdadeiras são um grupo de serpentes da família Elapidae, são espécies peçonhentas com veneno de ação neurotóxica (Bucarechi et al., 2016). Esse grupo é organizado em 3 gêneros *Micruroides*, *Leptomicrurus* e *Micrurus* (Roze, 1996; Campbell and Lamar, 2004). Atualmente são reconhecidas 82 espécies de cobras corais no novo mundo, destas, o gênero *Micrurus* representa 77 espécies (Silva Jr., Buononato, and Feitosa, 2016), com 36 espécies distribuídas pelo Brasil, sendo sete endêmicas (Costa and Bérnils, 2018). O gênero *Micrurus* apresenta duas linhagens filogenéticas que corresponde a padrões de coloração distintos (Slowinski, 1995), um grupo com espécies exibindo o padrão de anéis pretos arranjados em mônades (BRM) e um segundo grupo com o padrão de anéis pretos organizados em tríades (BRT)(Silva Jr. and Sites Jr., 1999; Campbell and Lamar, 2004).

Na literatura existem poucos dados em relação à história natural e biologia reprodutiva de cobras corais (Silva Jr., 2016), em comparação ao número de espécies existentes e também ao número de estudos disponíveis para viperídeos e colubrídeos. Alguns trabalhos mais aprofundados sobre questões reprodutivas no gênero *Micrurus*, como os de Almeida-Santos et al. (2006) e Marques et al. (2013), que foram essenciais para compreensão de aspectos reprodutivos como dimorfismo sexual, combate entre machos e alguns eventos reprodutivos. Com a análise desses caracteres reprodutivos, os autores propuseram a existência de padrões reprodutivos entre as espécies das duas linhagens.

A proposta desta pesquisa foi analisar as estratégias reprodutivas existentes das espécies do gênero *Micrurus*, com uma abordagem macroscópica e morfométrica, investigando as seguintes questões:

- i - existe um padrão de estratégias reprodutivas entre as espécies?
- ii - espécies da mesma linhagem, distribuídas em biomas diferentes, exibem o mesmo

padrão de estratégias reprodutivas?

iii – quais os tipos de ciclo espermatogênico existente nas espécies dos dois clados?

iv – a estocagem de espermatozoides ocorre nas espécies dos dois clados?

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Espécies e espécimes analisados

As espécies utilizadas no presente trabalho (Tabela 1), foram escolhidas pela proximidade filogenética (Slowinski, 1995; Zaher et al., 2016); pela disponibilidade de exemplares nas coleções biológicas e pela representatividade de cada espécie ter a distribuição em um bioma.

Tabela 1. Dados das espécies de cobra coral analisadas e número de exemplares examinados por estação. **BRM**: linhagem com o padrão de anéis arranjados em mônades; **BRT**: padrão de anéis em tríades.

Espécie	Linhagem	Bioma	Primavera	Verão	Outono	Inverno	Total
<i>Micrurus altirostris</i>	BRT	Pampa	10	9	13	9	41
<i>Micrurus ibiboboca</i>	BRT	Caatinga	8	11	13	11	41
<i>Micrurus frontalis</i>	BRT	Cerrado	8	9	10	5	32
<i>Micrurus surinamensis</i>	BRT	Amazônia	4	4	5	5	18
<i>Micrurus corallinus</i>	BRM	Mata Atlântica	9	9	8	7	33
<i>Micrurus paraensis</i>	BRM	Amazônia	4	3	4	3	14

Os espécimes analisados estão depositados nas seguintes coleções biológicas: Instituto Butantan (IB), Universidade Estadual de Campinas (ZUEC), Museu de História Natural Capão da Imbuia (MHNCI), Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ), Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (MCNR/PUC-MG), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), Fundação Zoobotânica (MCN/FZB), Instituto Nacional da Mata Atlântica (INMA), Universidade Federal de Pernambuco (CHUFPE), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Universidade Federal da Paraíba

(UFPB) e Universidade Federal do Acre (UFAC).

A análise dos eventos reprodutivos foi realizada conforme as estações do ano para o hemisfério sul (austral). Apenas espécimes adultos e que não apresentavam condições de degradação tecidual ou presença de parasitas no trato reprodutor, foram utilizados na análise.

## 2.2 - Área de distribuição dos espécimes

Os espécimes utilizados foram coletados em diferentes localidades no Brasil, os pontos específicos estão marcados no mapa de distribuição das espécies (Fig. 1).

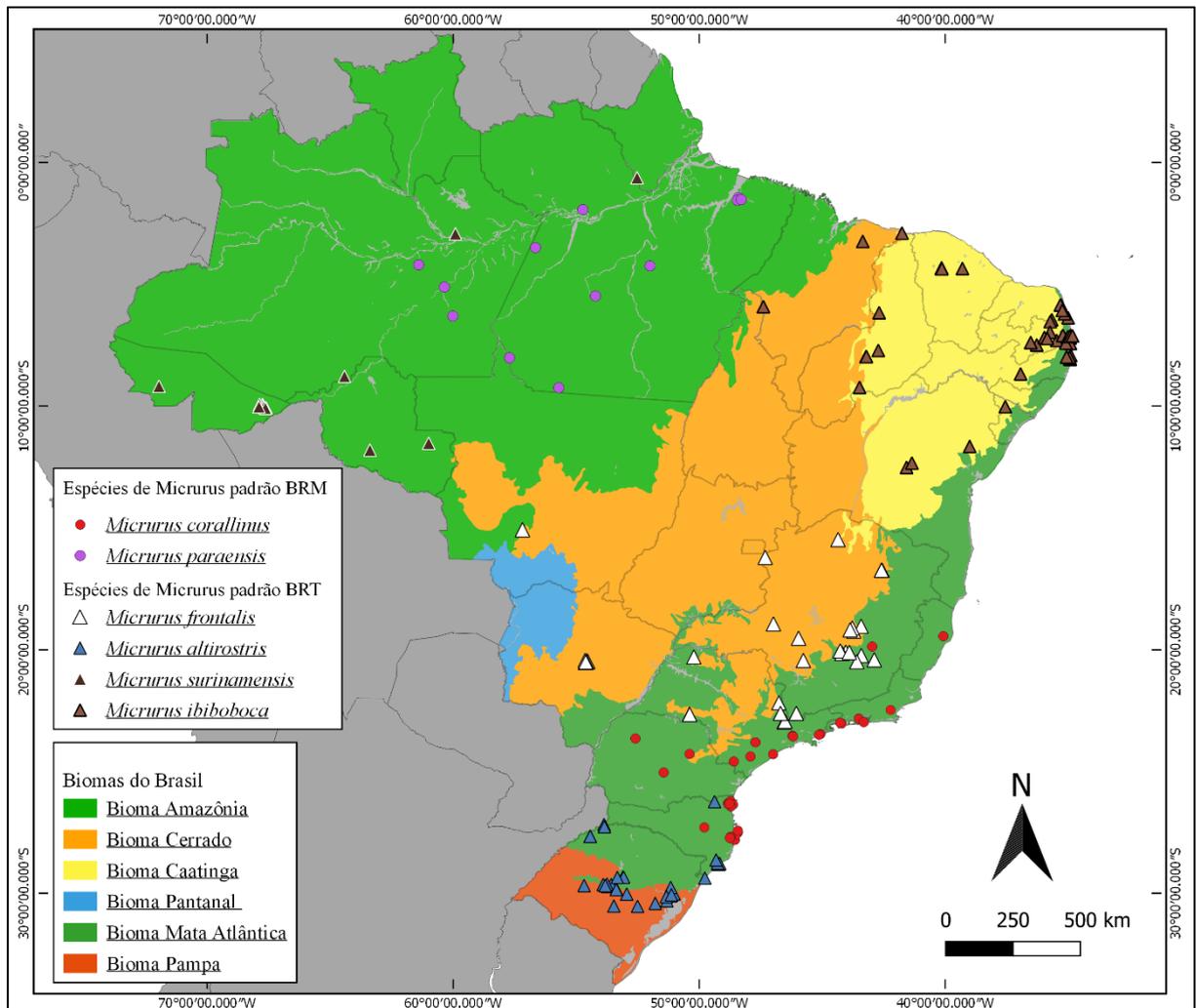


Figura 1. Mapa de biomas do Brasil com os limites da federação, apresentando a distribuição das espécies de cobra coral verdadeira. **BRM**: anéis pretos em mônades; **BRT**: anéis pretos em tríades.

A espécie *Micrurus corallinus* possui a distribuição do sul da Bahia ao Rio Grande do Sul (Marques, 1996; Campbell and Lamar, 2004), a Mata Atlântica pode exibir localidades com chuvas bem distribuídas ao longo do ano, aproximadamente 1.800-3.000 mm de chuva, dependendo da região (Coutinho, 2016), com curtos períodos de estiagem (geralmente entre o outono e inverno) e uma amplitude térmica podendo chegar 10-15°C (Mendonça and Danni-Oliveira, 2007). No sul do país temos a distribuição da espécie *M. altirostris* (Silva Jr. and Sites Jr., 1999; Silva Jr., 2016), presente em dois biomas, o da Mata Atlântica (porção sul) e o do Pampa (Campbell and Lamar, 2004). As condições climáticas são semelhantes à da Mata Atlântica, porém o frio do inverno é marcante, com registros de temperatura chegando abaixo de zero. As espécies *M. surinamensis* e *M. paraensis* estão distribuídas no bioma Amazônia (Silva Jr., 2016), região que exibe um intenso regime pluviométrico, com a média anual 2.145 mm de chuvas e um curto período de seca no inverno, entretanto há uma homogeneidade térmica ao longo do ano, com temperatura média 28,2°C (Mendonça and Danni-Oliveira, 2007).

No Cerrado temos a distribuição da espécie *M. frontalis* (Campbell and Lamar, 2004), região com o clima tropical estacional, possui temperaturas médias anuais de 20-22 °C até 24-26 °C e médias pluviométricas de 1.000 –1.800 mm anuais (Coutinho, 2016). E períodos bem definido de estiagem (aproximadamente 5 meses) (Mendonça and Danni-Oliveira, 2007). A espécie *M. ibiboboca* está distribuída tipicamente no bioma da Caatinga (Silva Jr., 2016), apresenta o tipo climático equatorial, no qual exibe alta sazonalidade no regime de chuvas, sendo com cinco meses de estiagem e sete meses com maior pluviosidade (Ab'Sáber, 2007). Dependendo da localidade pode haver considerável diferença no regime de chuvas de 2.300 mm (e.g., S. Luís do Maranhão) até 620 mm anuais (e.g., Campos Sales).

### **2.3 - Dados macroscópicos**

Os dados biométricos coletado de cada espécime foram: comprimento rostro-cloacal

(mm) e massa do corpo (g). Para análise de algumas porções do sistema reprodutor, realizamos uma incisão ventral, no terço final do corpo. Posteriormente, com auxílio de paquímetro eletrônico, coletamos as medidas de comprimento (a), largura (b), espessura (c) em milímetros; dos órgãos testículo e rim (ambos os lados) e com uma balança de precisão realizamos a pesagem dos órgãos em gramas. Para o ducto deferente, medimos apenas a espessura (mm).

Para o cálculo do volume dos órgãos utilizamos dois métodos: o primeiro com o uso da fórmula elipsoide  $\frac{4}{3}\pi\left(\frac{a}{2}\right)\left(\frac{b}{2}\right)\left(\frac{c}{2}\right)$  para obtenção do volume (Vol. E) em milímetros cúbicos (Pleguezuelos and Feriche, 1999). No segundo método utilizamos o princípio de Arquimedes, com o uso de uma proveta de 5 mL, realizamos a imersão do órgão em meio líquido e com deslocamento do líquido na proveta, obtivemos o volume líquido do órgão (Vol. L) em mililitro (cf., Scherle, 1970). O volume relativo do testículo, foi calculado pela fórmula volume do testículo/comprimento rostro-cloacal, e para a comparação entre espécies utilizamos a média do volume relativo. O índice gonadossomático (GSI) foi calculado pela fórmula massa do testículo/massa do corpo x 100 (Quinn, 1979).

#### **2.4 - Histologia e histoquímica**

Para histologia foram coletadas amostras do testículo, rim e ducto deferente (porção distal), utilizamos como padrão a coleta do lado direito, sendo preservado o órgão contralateral. As amostras passaram pelo processo de desidratação alcóolica crescente, xilol e inclusão em parafina (Junqueira, 1995). As lâminas foram confecção com cortes de 5-7  $\mu\text{m}$  de espessura, na posição longitudinal. A coloração básica para análise tecidual foi hematoxilina e eosina (H/E), e as avaliações foram feitas com o uso do microscópio Leica DM4 B com câmera DMC 4500 acoplada. Para histoquímica utilizamos o ácido periódico-Schiff (PAS) para identificação de carboidratos neutros, azul de alcian (AB) pH 2,5 para identificação de

glicosaminoglicanos carboxilados ou polissacarídeos ácidos e o azul brilhante de Coomassie (CB), para identificação de proteínas. Os protocolos utilizados foram Junqueira (1995) e do laboratório multiusuário de estudos em biologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ambos adaptados, pois realizamos a contra-coloração com hematoxilina para melhor delimitação de algumas regiões.

## 2.5 - Morfometria

As análises morfométricas foram realizadas nos três órgãos coletados (e.g., testículo, rim e ducto deferente), com a unidade de medida em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ). Para cada lâmina confeccionada, com cortes em alturas teciduais diferentes, fotografamos dez estruturas (i.e., túbulo seminífero, SSK e ducto deferente). Do testículo, especificamente o túbulo seminífero (Tsm), coletamos as medidas dos seguintes caracteres estruturais: altura do epitélio e diâmetro do Tsm. Das células de Leydig, coletamos as medidas: da área e diâmetro do núcleo. No rim, analisamos o segmento sexual renal (SSK), as medidas avaliadas foram: altura do epitélio, área do lúmen e área dos grânulos de secreção (caso estivessem presentes). No ducto deferente, as medidas coletadas foram: altura do epitélio, diâmetro do ducto e diâmetro da massa espermática presente no lúmen.

Para as estruturas com formato circular, em corte transversal, as medidas da altura do epitélio (e.g., túbulo seminífero, SSK e ducto deferente), foram feitas em quatro pontos (superior, inferior, lado direito e esquerdo) formando uma cruz. Utilizamos a média dos quatro pontos com única medida de caracter, referente a uma das dez estruturas avaliadas.

Todas as medições foram realizadas no *software Image Pro Plus 6.0*. Na análise qualitativa referente à variações observadas no túbulo seminífero, ao longo do ciclo espermatogênico, utilizamos a classificação proposta por Goldberg and Parker (1975): regressão completa (estágio I), começo da recrudescência (estágio II), final da recrudescência

(estágio III), começo da espermiogênese (estágio IV), espermiogênese (estágio V) e começo de regressão (estágio VI).

## 2.6 - Estratégias reprodutivas analisadas

As estratégias reprodutivas dos machos foram examinadas com base na composição de alguns eventos reprodutivos, como: ciclo espermatogênico, período de hipertrofia do SSK e estocagem de espermatozoides no ducto deferente. Para cada estratégia reprodutiva, utilizamos o agrupamento de algumas variáveis operacionais (e.g., biometria, morfometria e análise qualitativa), para permitir a avaliação do tipo de estratégia adotada em cada espécie (Tabela 2).

Tabela 2. Composição das estratégias reprodutivas e delineamento das medidas coletadas para análise. **DD**: Ducto deferente; **N.C.L**: núcleo das células de Leydig; **TSM**: túbulos seminíferos; **SSK**: segmento sexual renal.

Estratégias reprodutivas	Variações	Medidas coletadas
Periodicidade do Ciclo Espermatogênico	<b>Ciclo descontínuo</b> (com regressão)	<b>Biometria</b> Volume testicular Índice gonadossomático
	<b>Ciclo contínuo</b> (sem regressão)	<b>Morfometria</b> Altura do epitélio do TSM Diâmetro do TSM Diâmetro do N.C.L Área do N.L.C
		<b>Análise Qualitativa</b> Estágio do ciclo espermatogênico
Periodicidade de atividade do Segmento Sexual Renal	<b>Contínua</b> (sem alteração de hipertrofia)	<b>Biometria</b> Volume do Rim
	<b>Sazonal</b> (com alteração de hipertrofia)	<b>Morfometria</b> Altura do epitélio do SSK Diâmetro do SSK Área do lúmen do SSK Área dos grânulos no lúmen
Estocagem de espermatozoides no Ducto deferente	<b>Ausente</b> (produção contínua de espermatozoides no TSM)	<b>Biometria</b> Espessura do DD
	<b>Presente</b> Sem alteração no diâmetro do DD	<b>Morfometria</b> Altura do epitélio do DD Diâmetro do DD
	<b>Presente</b> Com alteração no diâmetro do DD (armazenamento elevado)	Diâmetro da massa espermática

## 2.7 - Maturidade sexual

A maturidade sexual foi caracterizada com base nas informações histológicas, do testículo e ducto deferente. Estabelecemos os espécimes como sexualmente maduros (ou adultos), quando apresentavam espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero e no ducto deferente, e aqueles que exibiam espermatozoides apenas no lúmen do ducto deferente.

## 2.8 - Estatística

As correlações do volume testicular com o comprimento rostro-cloacal e do volume testicular com a massa do corpo, foram testadas por regressão linear (Shine, 1977). Todos os dados que não passaram pelo teste de aderência à normalidade, foram transformados para Log, Box-cox ou raiz cúbica (medidas de volume), obtendo assim uma distribuição paramétrica. As comparações das médias de volume testicular, volume renal e espessura do ducto deferente entre as estações, foram realizadas pelo teste de covariância (ANCOVA); complementado pelo teste *post-hoc Sidak e Tukey*, o Crc foi utilizado como covariável. A comparação das médias do GSI foi realizada pelo teste ANOVA; complementado pelo teste *post-hoc Tukey*. Para as análises dos dados morfométricos, as comparações das médias entre as estações foram testadas pela análise de variância (ANOVA); complementado pelo teste *post-hoc Tukey*. Para *M. paraensis*, devido ao número amostral apenas alguns testes foram realizados comparando outono e inverno, neste caso, o teste utilizado foi o teste *T-Student*. Os softwares utilizados na estatística foram o IBM SPSS “*Statistical Package for the Social Sciences*” e o Minitab 17, assumindo como nível de significância  $P < 0,05$ .

### 3– RESULTADOS

#### 3.1 -Ciclo reprodutivo em *Micrurus corallinus*

Na espécie *Micrurus corallinus* obtivemos correlação do volume do testículo (Vol.E/Vol.L) com Crc (Vol.E,  $r = 0,57$ ;  $P = 0,001$ / Vol.L,  $r = 0,69$ ;  $P < 0,001$ ). Na comparação das médias de volume do testicular entre as quatro estações, não houve diferença significativa (Ancova,  $F = 0,77$ ;  $P = 0,521$ ; Vol.E/ Ancova,  $F=1,13$ ;  $P = 0,358$ ). O índice gonadossomático (GSI) mostrou diferença significativa na média ao longo do ano (Anova,  $F = 5,11$ ;  $P = 0,008^*$ ; Fig. 2A), houve uma diminuição da média no verão, em comparação com outono e inverno (*post-hoc Sidak*,  $P = 0,012$  e  $P = 0,019$ , respectivamente). O volume renal apresentou variação significativa (Ancova,  $F = 7,15$ ;  $P = 0,001^*$ ), com o inverno exibindo a maior média de volume em comparação com verão e outono (*post-hoc Sidak*,  $P < 0,05$ ; ambas as comparações; Fig. 2B). Encontramos diferença significativa na espessura do ducto deferente (Anova,  $F = 5,50$ ,  $P = 0,005^*$ ; Fig. 2C), os maiores valores da média de espessura ocorrendo no inverno e primavera, diferindo da média do verão (*post-hoc Tukey*, PRI-VER:  $P = 0,015^*$ ; INV-VER:  $P = 0,022^*$ ).

Na morfometria do testículo, obtivemos diferença significativa na altura do epitélio seminífero entre as estações do ano (Anova,  $F=33,92$ ;  $P < 0,001$ ), com as maiores médias de altura ocorrendo no outono e inverno (*post-hoc Tukey*,  $P < 0,001$ ; para ambas; Fig. 2D), e uma diminuição acentuada na primavera e verão (Fig. 2D). Não foram constatadas diferenças nas médias do diâmetro do túbulo seminífero (Anova,  $F=2,50$ ;  $P = 0,087$ ), o mesmo resultado foi observado para o diâmetro (Anova,  $F=0,74$ ;  $P = 0,535$ ) e área do núcleo das células de Leydig (Anova,  $F=1,91$ ;  $P= 0,084$ ). Para SSK evidenciamos diferença significativa na altura do epitélio do segmento sexual renal (Anova,  $F = 6,68$ ;  $P = 0,002^*$ ), com maior hipertrofia no inverno, sendo significativa a diferença entre inverno-verão (*post-hoc Tukey*,  $P = 0,002^*$ )

e inverno-outono (*post-hoc Tukey*,  $P = 0,046^*$ ; Fig. 2E). O diâmetro do SSK apresentou resultado semelhante, com diferença significativa (Anova,  $F = 13,21$ ;  $P < 0,001^*$ ), sendo o inverno a maior média do diâmetro (Fig. 2F), verificamos um aumento gradual de SSK com grânulos presentes no lúmen, com maior área luminal ocupada na estação do inverno (Fig. 3A). Não houve diferença significativa na variação da média de área do lúmen do SSK (Anova,  $F = 2,32$ ;  $P = 0,106$ ). No ducto deferente, evidenciamos variação significativa no diâmetro ao longo do ano (Anova,  $F = 9,00$ ;  $P < 0,001$ ), com a menor média ocorrendo na estação do verão (Fig. 3B), diferindo significativamente ao com as médias da primavera e inverno (*post-hoc Tukey*,  $P < 0,01$ , em ambas as comparações). Obtivemos resultado semelhante para o diâmetro da massa espermática (Anova,  $F = 7,93$ ;  $P = 0,001^*$ ; Fig. 3C). E para altura do epitélio, não houve diferença significativa entre as estações (Anova,  $F = 0,564$ ;  $P = 0,644$ ).

Na análise qualitativa (Fig. 4), o testículo exibiu o período de quiescência do epitélio germinativo (estágio I), ocorrendo na primavera por um curto período (novembro e dezembro). No início do verão (janeiro-fevereiro) temos o estágio II, identificado pela proliferação de espermatogônias e espermátócitos; o estágio III foi evidenciado em março, somente em um espécime. No início do outono identificamos o início da espermiogênese (estágio IV), e o processo final correspondente à presença de espermatozoides maduro no lúmen foi observado do outono ao inverno (maio-setembro).

### **3.2 -Ciclo reprodutivo em *Micrurus frontalis***

Em *Micrurus frontalis*, evidenciamos correlação positiva do volume do testículo com o Crc, porém essa correlação só foi significativa para o volume elipsoide (Vol.E,  $r = 0,41$ ;  $P = 0,034$ ), não sendo detectada no volume líquido (Vol.L,  $r = 0,27$ ;  $P = 0,322$ ). Na comparação

das médias não houve diferença significativa para o volume testicular (Ancova,  $F = 1,06$ ;  $P = 0,386$ ; Vol. E / Ancova,  $F = 2,10$ ;  $P = 0,069$ ; Vol.L), índice gonadossomático (Anova,  $F = 1,48$ ;  $P = 0,243$ ), volume renal (Ancova,  $F = 0,892$ ;  $P = 0,460$ ) e espessura do ducto deferente (Anova,  $F = 1,97$ ,  $P = 0,144$ ).

Na morfometria *Micrurus frontalis* exibiu variação significativa da média do diâmetro do túbulo seminífero entre as estações (Anova,  $F=4,52$ ;  $P = 0,014^*$ ), apresentando diminuição acentuada no inverno, em comparação com o verão (*post-hoc Tukey*,  $P = 0,013^*$ ; Fig. 5A). Não houve diferença significativa na altura do epitélio seminífero (Anova,  $F=2,00$ ;  $P = 0,145$ ), na área (Anova,  $F=1,98$ ;  $P = 0,149$ ) e diâmetro do núcleo das células de Leydig (Anova,  $F=1,16$ ;  $P = 0,348$ ). Observamos uma diferença significativa na média da altura do epitélio do SSK (Anova,  $F = 13,41$ ;  $P < 0,001^*$ ), entre as estações verão-inverno, com as maiores médias e uma queda significativa na primavera (primavera com outras estações: *post-hoc Tukey*,  $P > 0,05^*$ ; Fig. 5B). De forma semelhante, o diâmetro do SSK exibiu variação na média (Anova,  $F = 11,81$ ;  $P < 0,001^*$ ), diferindo na primavera com as demais estações (primavera-outras estações: *post-hoc Tukey*,  $P > 0,05^*$ ; Fig. 5C). Não houve diferença na área luminal do SSK (Anova,  $F=3,01$ ;  $P = 0,063$ ), entretanto, os grânulos de secreção foram evidenciados no lúmen do SSK com maior frequência no inverno (Fig. 5D). No ducto deferente, não evidenciamos diferenças significativas para a altura do epitélio (Anova,  $F= 3,04$ ;  $P = 0,059$ ), diâmetro do ducto deferente (Anova;  $F= 1,03$ ;  $P = 0,403$ ) e diâmetro da massa espermática (Anova,  $F= 2,04$ ;  $P = 0,148$ ). No ducto deferente constatamos a presença de cristas, características da estrutura da *ampulla* (Fig. 5E, F), nos espécimes UFOP-598 (primavera) e UFMS - 1416 (verão).

No exame qualitativo dos estágios do ciclo espermatogênico, para a espécie *M. frontalis*, não evidenciamos a presença do estágio I, correspondente ao período de pausa do epitélio germinativo. Nesta espécie, de novembro até meados de fevereiro, identificamos

exemplares exibindo os estágios II ou III; a partir do mês de março, encontramos o início da espermiogênese (estágio IV), no qual há espermátides em diferentes estágios. Ao longo do outono e inverno, tivemos a presença de espécimes com os estágios IV e V, sendo então o período de pico da espermiogênese até o início da primavera.

### 3.3 -Ciclo reprodutivo em *Micrurus altirostris*

Na espécie *Micrurus altirostris* identificamos que há correlação positiva do volume testicular com Crc (Vol. E:  $r = 0,48$ ;  $P = 0,006$  / Vol. L:  $r = 0,42$ ;  $P = 0,017$ ). O volume do testículo não apresentou variação da média, na comparação entre as estações (Ancova,  $F = 2,52$ ;  $P = 0,080$ ; Vol.E/ Ancova,  $F = 0,152$ ;  $P = 0,765$ ; Vol.L). O mesmo resultado foi observado para o GSI (Anova,  $F = 2,71$ ;  $P = 0,065$ ), para o volume renal (Ancova,  $F = 0,252$ ,  $P = 0,859$ ) e espessura do ducto deferente (Anova,  $F = 1,85$ ;  $P = 0,157$ ).

Na morfometria, verificamos variação na média da altura do epitélio seminífero (Anova,  $F = 5,70$ ;  $P = 0,005$ ), sendo significativa a diferença entre primavera e o verão (*post-hoc Tukey*,  $P = 0,004$ ; Fig. 6A). Para os outros parâmetros não houve diferença significativa no diâmetro do túbulo seminífero (Anova,  $F = 2,00$ ;  $P = 0,144$ ); diâmetro do núcleo das células de Leydig (Anova,  $F = 1,83$ ;  $P = 0,171$ ) e área do núcleo das células de Leydig (Anova,  $F = 2,41$ ;  $P = 0,095$ ). No SSK houve diferença significativa na altura do epitélio (Anova,  $F = 3,43$ ;  $P = 0,036^*$ ), sendo verão e outono as maiores médias, quando comparados com o inverno (*post-hoc Tukey*,  $P = 0,042$ ; Fig. 6B). Resultado semelhante foi observado no diâmetro do SSK, com diferença significativa (Anova,  $F = 4,62$ ;  $P = 0,012^*$ ; Fig. 6C), com a menor média ocorrendo no inverno, diferindo de verão e outono (*post-hoc Tukey*,  $P < 0,05$ ). Não houve diferença nas médias das áreas do lúmen do SSK (Anova,  $F = 1,84$ ;  $P = 0,169$ ), porém observamos no outono a maior incidência de grânulos no lúmen do SSK (Fig. 6D). No ducto deferente, não houve diferença entre as médias da altura do epitélio (Anova,  $F = 2,39$ ;  $P$

= 0,091), diâmetro do ducto (Anova,  $F = 2,72$ ;  $P = 0,065$ ) e diâmetro da massa espermática (Anova,  $F = 2,36$ ;  $P = 0,094$ ).

Na análise qualitativa (Fig. 7), referente ao ciclo espermatogênico, constatamos o estágio I ocorrendo de meados do inverno até início da primavera (agosto-outubro), sendo caracterizado pela quiescência epitelial. O estágio II foi evidenciado ao longo da primavera, com o epitélio germinativo apresentava a recrudescência. Os estágios III e IV foram evidenciados ao longo do verão (dezembro-fevereiro). O estágio V, ocorrendo do final do verão ao longo de todo outono, os espécimes exibiam a espermiogênese. E o estágio VI, início da regressão, foi identificado em meados do outono até o inverno.

#### 3.4 -Ciclo reprodutivo em *Micrurus surinamensis*

Espécimes machos de *Micrurus surinamensis* não apresentaram correlação significativa do volume do testículo com Crc (Vol. E,  $r = 0,34$ ;  $P = 0,234$ / Vol. L,  $r = 0,13$ ;  $P = 0,322$ ). O volume testicular não apresentou diferenças significativas (Ancova,  $F = 0,367$ ;  $P = 0,779$ ; Vol. E / Ancova,  $F = 0,152$ ;  $P = 0,926$ ; Vol. L). Entretanto, o GSI mostrou variação entre as médias (Anova,  $F = 13,56$ ;  $P = 0,001^*$ ), com um aumento do índice no inverno, diferenciando-se das outras estações (*post-hoc Tukey*,  $P < 0,05$ , Fig. 8A). Não apresentaram diferenças significativas entre as estações, o volume do rim (Ancova,  $F = 2,88$ ;  $P = 0,095$ ) e a espessura do ducto deferente (Anova,  $F = 2,05$ ;  $P = 0,170$ ).

Na morfometria do testículo, verificamos diferenças significativas na altura do epitélio seminífero (Anova,  $F = 11,27$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 8B), com a maior média ocorrendo no outono e uma queda acentuada no inverno (*post-hoc Tukey*, OUT-INV:  $P = 0,013$ ; OUT-PRI:  $P = 0,009$ ). O diâmetro do túbulo seminífero apresentou variação entre as médias (Anova,  $F = 3,89$ ;  $P = 0,033$ ), com o verão exibindo a maior média do diâmetro e o inverno a menor (*post-hoc Tukey*, VER-INV:  $P = 0,040^*$ ; Fig. 8C). Para o diâmetro do núcleo das células de Leydig,

observamos uma diferença significativa (Anova,  $F = 5,65$ ;  $P = 0,009^*$ ), pela diminuição da média no outono, em relação ao verão (*post-hoc Tukey*,  $P = 0,015^*$ ; Fig. 8D). Não constatamos diferenças significativas na área do núcleo das células de Leydig (Anova,  $F = 3,56$ ;  $P = 0,052$ ). Para o rim, verificamos que não houve diferenças significativas na altura do epitélio do SSK (Anova,  $F = 1,48$ ;  $P = 0,279$ ), na área do lúmen do SSK (Anova,  $F = 0,290$ ;  $P = 0,832$ ) e no diâmetro do SSK (Anova,  $F = 0,307$ ;  $P = 0,820$ ). Os grânulos de secreção no lúmen do SSK foram observados com maior frequência na primavera e no outono. No ducto deferente, a espécie *Micrurus surinamensis* não apresentou diferenças significativas nas médias da altura do epitélio (Anova,  $F = 0,145$ ;  $P = 0,930$ ), no diâmetro do ducto deferente (Anova,  $F = 0,119$ ;  $P = 0,947$ ) e no diâmetro da massa espermática (Anova,  $F = 0,271$ ;  $P = 0,845$ ).

Na análise qualitativa (Fig. 7), referente ao ciclo espermatogênico, não identificamos os estágios I, II e III. Do verão a meados do outono (fevereiro-junho) os espécimes apresentavam o estágio IV do ciclo, o epitélio do túbulo seminífero exibia espermatídes em diferentes estágios de desenvolvimento (s3-s7). Do outono a meados do inverno, observamos túbulos seminíferos com espermatozoides na área luminal, caracterizando o estágio V. Do inverno a primavera (agosto-novembro) verificamos uma transição, do estágio V para estágio VI, o epitélio seminífero apresentava baixa quantidade de espermatogônias e espermatócitos (2-4 camadas), e a maioria das espermatídes estavam no final de se estágio de desenvolvimento.

### 3.5 -Ciclo reprodutivo em *Micrurus ibiboboca*

Espécimes machos de *Micrurus ibiboboca* não apresentaram correlação significativa do volume do testículo com o Crc (Vol. E,  $r = 0,13$ ;  $P = 0,665$ / Vol. L,  $r = 0,30$ ;  $P = 0,298$ ).

Não constatamos variação significativa da média no volume do testículo (Ancova,  $F = 0,80$ ;  $P = 0,522$ ; Vol.E/ Ancova,  $F = 1,10$ ;  $P = 0,398$ ; Vol.L) e no índice gonadossomático (GSI) (Anova,  $F = 0,70$ ;  $P = 0,574$ ). O volume do rim exibiu variação significativa (Ancova,  $F = 6,11$ ;  $P = 0,015^*$ ), pela diminuição do volume no inverno (*post-hoc Tukey*,  $P = 0,015^*$ ; Fig. 8E). E o ducto deferente não apresentou variação significativa (Anova,  $F = 1,28$ ;  $P = 0,333$ ).

Na morfométrica do testículo, não constatamos diferença significativa na altura do epitélio seminífero (Anova,  $F = 2,21$ ;  $P = 0,112$ ), no diâmetro do túbulo seminífero (Anova,  $F = 1,06$ ;  $P = 0,492$ ) e na área do núcleo das células de Leydig (Anova,  $F = 1,35$ ;  $P = 0,281$ ). Entretanto, há uma variação significativa na média do diâmetro do núcleo das células de Leydig (Anova,  $F = 5,75$ ;  $P = 0,004^*$ ), com a maior média ocorrendo na estação da primavera em relação as outras estações (*post-hoc Tukey*,  $P < 0,05^*$ ; Fig. 8F). Para o rim, não houve variação entre as médias da altura do epitélio do SSK (Anova,  $F = 1,06$ ;  $P = 0,381$ ), do diâmetro do SSK (Anova,  $F = 0,693$ ;  $P = 0,568$ ) e na área do lúmen do SSK (Anova,  $F = 0,512$ ;  $P = 0,679$ ). Os grânulos de secreção no lúmen do SSK foram observados em todas as estações, porém em maior quantidade no verão. Para o ducto deferente, não houve variação significativas para altura do epitélio (Anova,  $F = 1,63$ ;  $P = 0,208$ ), diâmetro do ducto deferente (Anova,  $F = 0,526$ ;  $P = 0,669$ ) e diâmetro da massa espermática (Anova,  $F = 0,996$ ;  $P = 0,411$ ).

Na análise qualitativa do testículo evidenciamos o estágio I ocorrendo no inverno (agosto) e primavera (outubro), o epitélio germinativo apresentava 1-2 camadas de espermatogônias e o lúmen estava ausente de espermatozoides, caracterizando assim a regressão total. Os estágios II e III, correspondentes a recrudescência, não foram evidenciados nos exemplares analisados. Os estágios IV e V foram constatados do final da primavera até o outono (dezembro-julho). No inverno (meados de setembro) verificamos alguns espécimes apresentando o túbulo seminífero no estado de transição para a regressão e outros já em estavam no estágio VI, referente ao início da regressão.

### 3.6 -Ciclo reprodutivo em *Micrurus paraensis*

Espécimes machos de *Micrurus paraensis* exibiram correlação positiva entre o volume testicular e o Crc (Vol. E,  $r = 0,69$ ;  $P = 0,009$ / Vol. L,  $r = 0,55$ ;  $P = 0,024$ ). Para essa espécie constatamos uma diferença na média do volume do testículo (Ancova,  $F = 19,0$ ;  $P = 0,001^*$ ; Vol. E/ Ancova,  $F = 11,72$ ;  $P = 0,003^*$ ; Vol. L), apresentando a maior média volumétrica no outono, sendo significativamente diferente do inverno e primavera (*post-hoc Tukey*,  $P < 0,05^*$ ; Fig. 9A, B). O GSI apresentou variação entre as médias (Anova,  $F = 11,24$ ;  $P = 0,002$ ), sendo o outono a estação com maior média e significativamente diferente, quando comparado com a primavera (*post-hoc Tukey*,  $P = 0,02^*$ ) e o verão (*post-hoc Tukey*,  $P = 0,018^*$ ; Fig. 9C). O volume renal não apresentou variação significativa (Ancova,  $F = 2,01$ ;  $P = 0,191$ ). O ducto deferente apresentou diferença significativa na espessura (Anova,  $F = 34,39$ ;  $P = 0,001$ ; Fig. 9D), com as estações outono e inverno exibindo as maiores médias de espessura, quando comparados com a primavera e o verão (*post-hoc Tukey*,  $P < 0,05^*$ , para ambas as comparações). Macroscopicamente evidenciamos diferença na espessura do ducto deferente (região distal), na comparação entre os exemplares com comprimento rostro-cloacal e massa do corpo semelhantes (Fig. 9E): MPEG – 26525 (coletado no outono; Crc = 382 mm; 19,01 g), e INPA – 26774 (coletado na primavera; Crc = 390 mm; e 21,60 g).

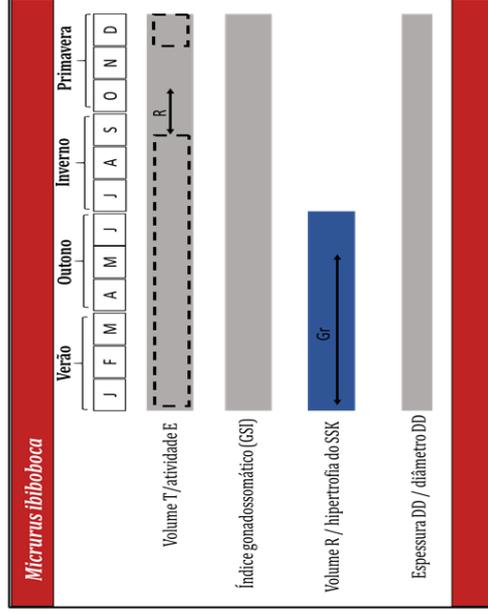
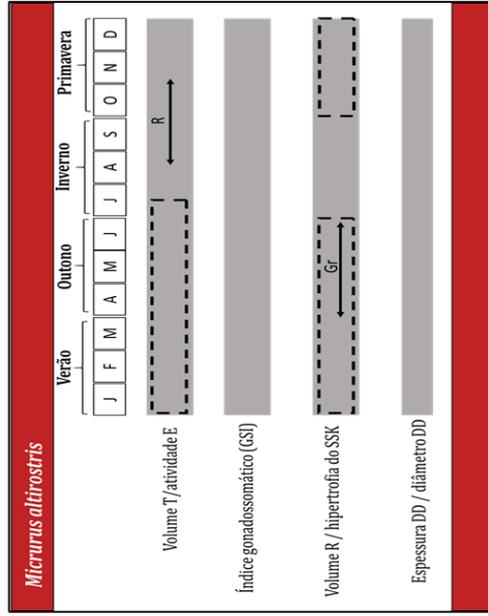
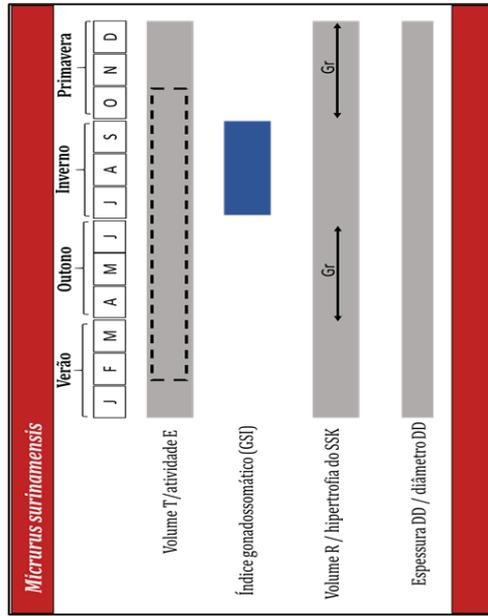
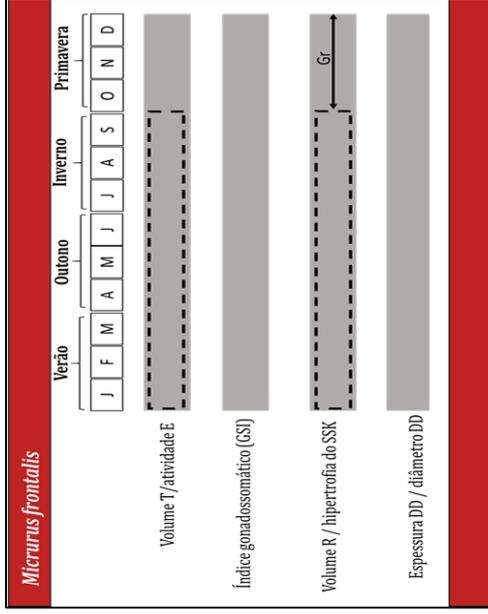
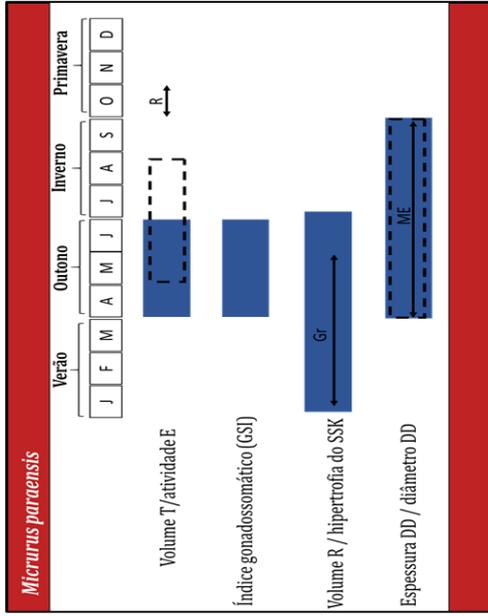
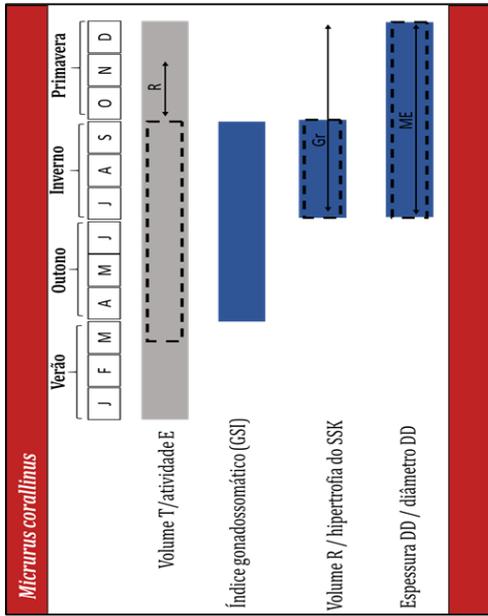
Na morfometria do testículo as únicas estações que obtiveram o número amostral mínimo para análise foram outono e inverno. O diâmetro do túbulo seminífero apresentou diferença da média do outono em relação ao inverno (Teste-t,  $t(6) = 2,57$ ;  $P = 0,043^*$ ; Fig. 9F). Não evidenciamos variação significativa para a altura do epitélio seminífero (Teste-t,  $t(6) = 1,16$ ;  $P = 0,288$ ), diâmetro do núcleo das células de Leydig ( $t(6) = 1,94$ ;  $P = 0,100$ ) e área do núcleo das células de Leydig (Teste-t,  $t(6) = 1,26$ ;  $P = 0,253$ ). O SSK não apresentou diferença nas médias da altura do epitélio do SSK (Teste-t,  $t(5) = 0,784$ ;  $P = 0,469$ ), área do lúmen do SSK (Teste-t,  $t(5) = 0,729$ ;  $P = 0,499$ ), e diâmetro do SSK (Teste-t,  $t(5) = 0,903$ ;  $P =$

0,408). Em ambas as estações constatamos a presença de grânulos de secreção no espaço luminal do SSK. O ducto deferente não houve diferença na altura do epitélio (Anova,  $F = 1,11$ ;  $P = 0,388$ ). O diâmetro do ducto deferente exibiu diferença significativa (Anova,  $F = 5,257$ ,  $P = 0,020^*$ ), sendo a maior média no inverno e uma queda significativa na primavera (*post-hoc Tukey*,  $P = 0,027^*$ ; Fig. 10A). Para o diâmetro da massa espermática houve diferença significativa na média (Anova,  $F = 6,768$ ;  $P = 0,009^*$ ), a primavera apresentou a menor média em relação as outras estações (*post-hoc Tukey*,  $P < 0,05$ , em ambas as comparações; Fig. 10B).

Na análise qualitativa (Fig. 11), para o ciclo espermatogênico não identificamos os estágios II, III ao longo do ano. O estágio III foi constatado em fevereiro (verão), e o estágio IV no início de março, sendo esse correspondente ao início da espermiogênese. O estágio V referente a intensa produção de espermatozoides, foi constatado do outono ao início do inverno (abril a julho). Na primavera, observamos espécimes com túbulos seminíferos no estágio VI e outros já apresentando sinais do estágio I (transição), referente ao começo de regressão para regressão total, sendo caracterizado pelo epitélio do túbulo seminífero com 1-2 camadas de células germinativas e ausência de espermatozoides no lúmen.

Resumo das estratégias reprodutivas observadas nas espécies de *Micrurus*. (DD): ducto deferente; (SSK): segmento sexual renal. (Fonte: produção do autor)

Espécie	Estratégias reprodutivas		
	Ciclo Reprodutivo	Atividade do SSK	Estocagem do DD
<i>Micrurus corallinus</i>	descontínuo	sazonal	presente (armazenamento elevado)
<i>Micrurus paraensis</i>	descontínuo	sazonal	presente (armazenamento elevado)
<i>Micrurus frontalis</i>	contínuo	sazonal	ausente
<i>Micrurus surinamensis</i>	contínuo	contínua	ausente
<i>Micrurus altirostris</i>	descontínuo	sazonal	presente
<i>Micrurus ibiboboca</i>	descontínua	contínua	presente



Resumo dos ciclos reprodutivos de algumas espécies de coral verdadeira do gênero *Micrurus*. Biometria, **faixa cinza**: Não houve variação significativa entre as estações; **faixa azul**: comprimento da faixa indica o período de maior média observada ( $P < 0,05$ ). Morfometria e análise qualitativa, **linha tracejada**: indicação do período de maior atividade; **linha tracejada ausente** não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ). (**Atividade E**) atividade espermatogênica; (**Gr**): período que o segmento sexual renal está liberando grânulos de secreção no lúmen; (**ME**): período de máxima estocagem do ducto deferente; (**R**): regressão do epitélio germinativo; (**SSK**): segmento sexual renal; (**Volume R**): volume do rim; (**Volume T**): volume do testículo.

### 3.7 -Comparativo do potencial reprodutivo

Na análise do potencial reprodutivo, constatamos que há diferença significativa do volume relativo do testículo entre as espécies (Anova,  $F = 39,89$ ;  $P < 0,001$ ), as espécies *Micrurus corallinus*, *M. paraensis* e *M. surinamensis* exibiram médias de volumes significativamente maiores ( $P < 0,001$ , comparações com as outras espécies; Fig.10C). Na comparação do GSI, houve diferenças entre as espécies (Anova,  $F = 77,28$ ;  $P < 0,001$ ), sendo *M. corallinus* e *M. paraensis* com os maiores índices gonadossomático, em relação as outras espécies ( $P < 0,001$ , comparação com as espécies; Fig. 10D). Ao mesmo tempo, *M. corallinus* e *M. paraensis* exibem as menores médias de comprimento rostro-cloacal (Fig. 10E).

### 3.8 -Maturidade sexual

A maturidade sexual foi constatada em *M. corallinus* no espécime com 473 mm de Crc (MNRJ-8239), sendo evidenciado espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero. O espécime foi coletado na primavera, apresentava o epitélio do túbulo seminífero em estado de quiescência, enquanto, o ducto deferente apresentava espermatozoides no lúmen. Outro exemplar de *M. corallinus* com Crc 420 mm (IB – 86060), não mostrou espermatozoides. No túbulo seminífero e no ducto deferente. Para a espécie *Micrurus frontalis* evidenciamos o menor espécime maduro com 640 mm (ZUEC – 82) com espermatozoide no ducto deferente. Em *M. altirostris* a medida no menor macho maduro foi de 477 mm de Crc (MCN\_FZB – 10963) com espermatozoides no túbulo seminífero e ducto deferente. A espécie *M. surinamensis* teve como menor macho maduro o espécime com 552 mm de Crc (INPA – 12090), coletado na estação do outono, apresentava o túbulo seminífero em espermiogênese e o ducto deferente com espermatozoides no lúmen. Em *M. ibiboboca* o menor macho maduro tinha 420 mm de Crc (UFPB – 27216), apenas foi constatado espermatozoides no ducto deferente. E para *M. paraensis* o exemplar maduro de menor comprimento possui 390 mm

(MPEG – 26526), coletado no outono, o túbulo seminífero estava em estágio de espermiogênese e o havia espermatozoides armazenados no ducto deferente.

### 3.9 -Pranchas com as figuras referentes aos resultados

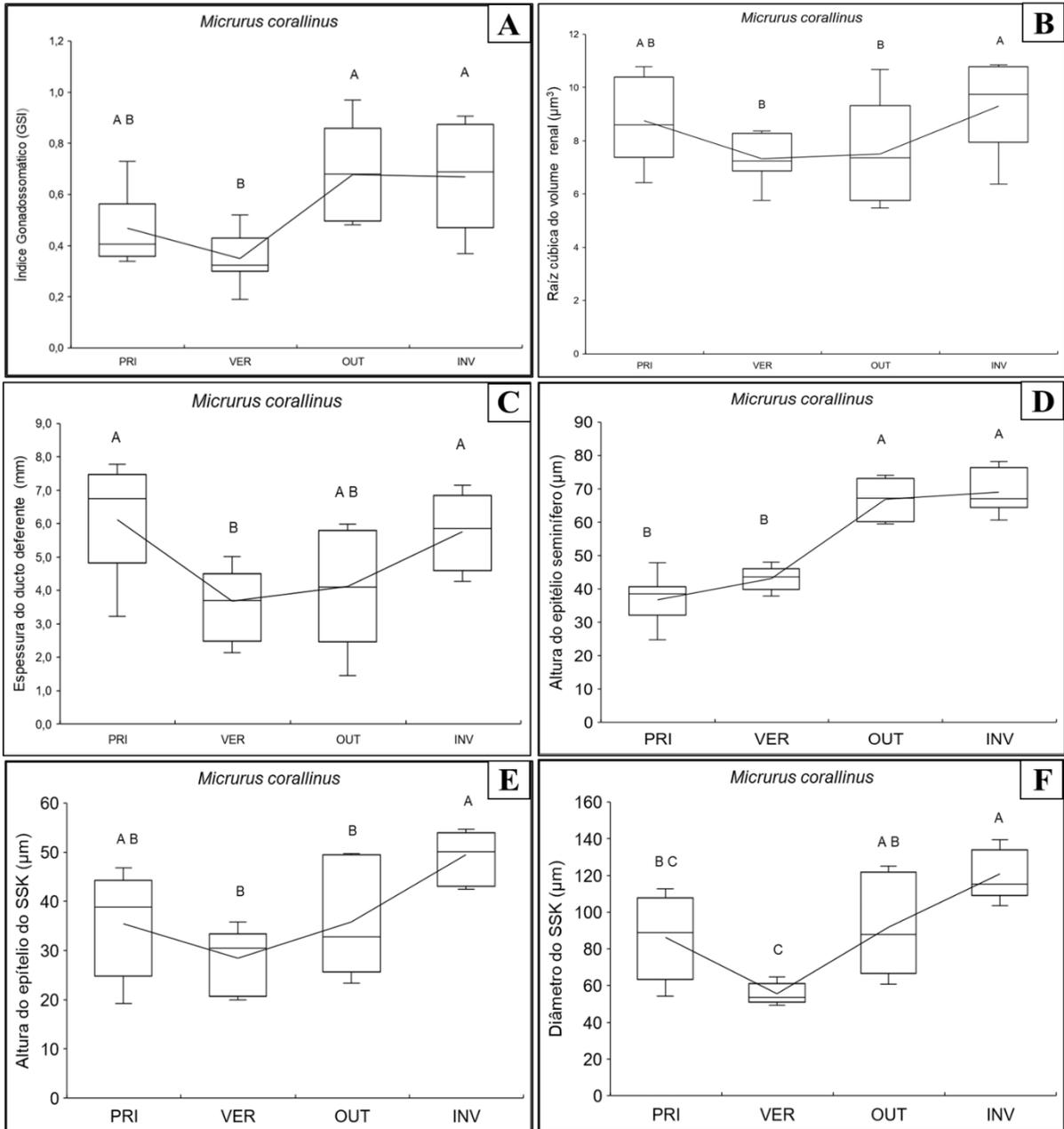


Figura 2. Prancha com os diagramas de caixa, referente as comparações biométricas e morfométricas entre as estações do ano, espécie *Micrurus corallinus*. Reta interligando os diagramas de caixas, indica a média de cada grupo. (A-C) biometria do testículo, rim e ducto deferente. (D-F) morfometria do testículo, rim e ducto deferente. Letras diferentes entre os diagramas de caixas (estações), indicam variação significativa entre as médias ( $P < 0,05$ ). (INV) inverno; (OUT) outono; (PRI) primavera; (VER) verão. (Fonte: produção do autor).

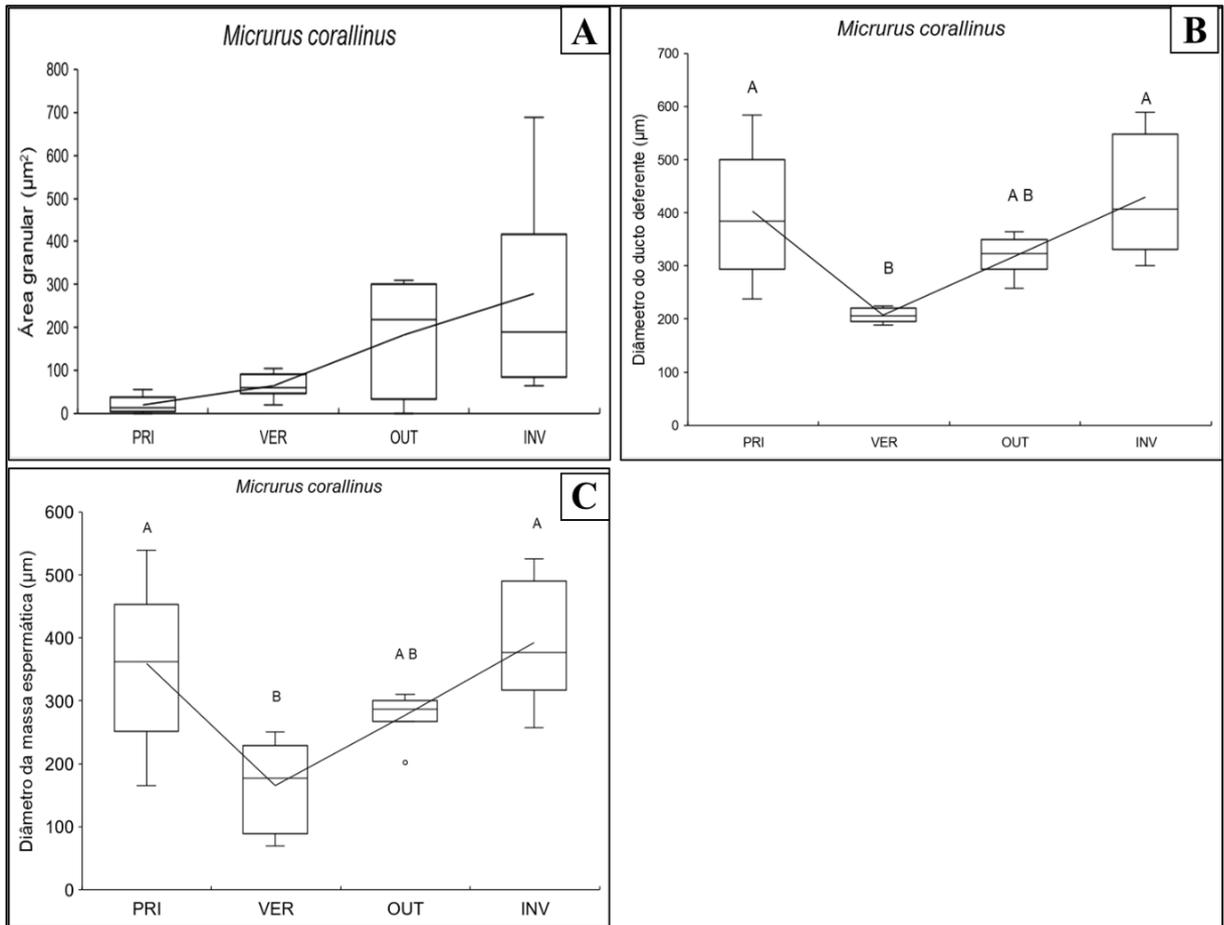


Figura 3. Prancha com os diagramas de caixa, referente as comparações morfométricas entre as estações do ano. A linha entre as caixas, indica a média de cada grupo. Reta interligando os diagramas de caixas, indica a média de cada grupo. (A) área dos grânulos presentes no lúmen do segmento sexual renal, *Micrurus corallinus*. (B-C) ducto deferente, diâmetro do ducto e massa espermiática presente no lúmen, *Micrurus corallinus*. Letras diferentes entre os diagramas de caixas (estações), indicam variação significativa entre as médias ( $P < 0,05$ ), na ausência de letras, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ). (INV) inverno; (OUT) outono; (PRI) primavera; (VER) verão.

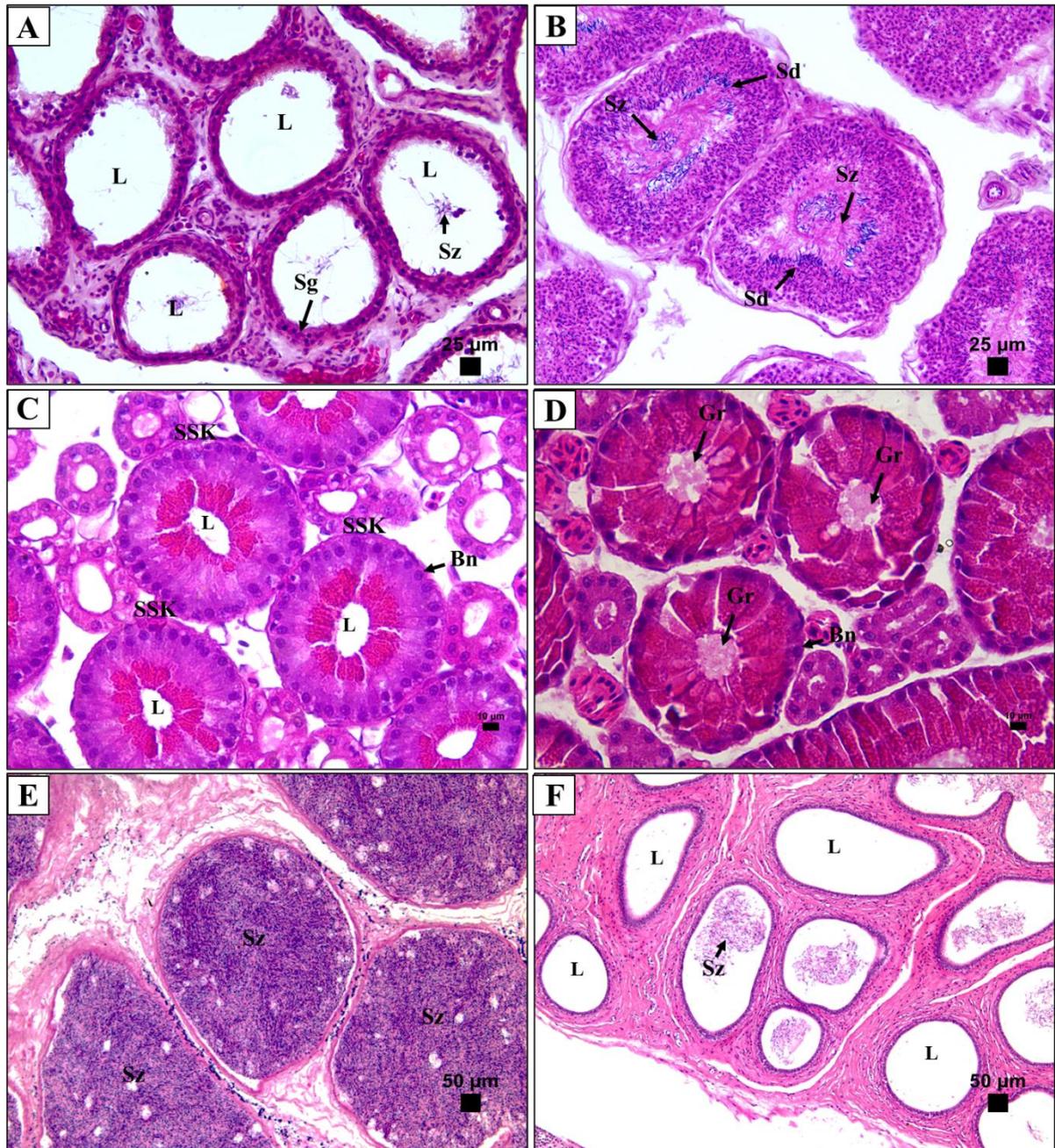


Figura 4. Fotomicrografia do testículo, rim e ducto deferente em *Micrurus corallinus*, com cortes longitudinais. (H/E). (A) túbulo seminífero em regressão total, exibindo lúmen praticamente ausente de espermatozoides, estação primavera. (B) túbulo seminífero em espermiogênese, inverno. (C) segmento sexual renal, estações primavera lúmen do SSK sem grânulos. (D) segmento sexual renal exibindo espaço luminal com grânulos, inverno. (E) Ducto deferente apresentando espermatozoides estocados no lúmen, estação primavera. (F) Ducto deferente apresentando lúmen praticamente ausente de espermatozoides, estação verão. (Bn) núcleo basal; (Gr) grânulos; (L) lúmen; (Sd) espermátide; (Sg) espermatogônia; (SSK) segmento sexual renal; (Sz) espermatozoides.

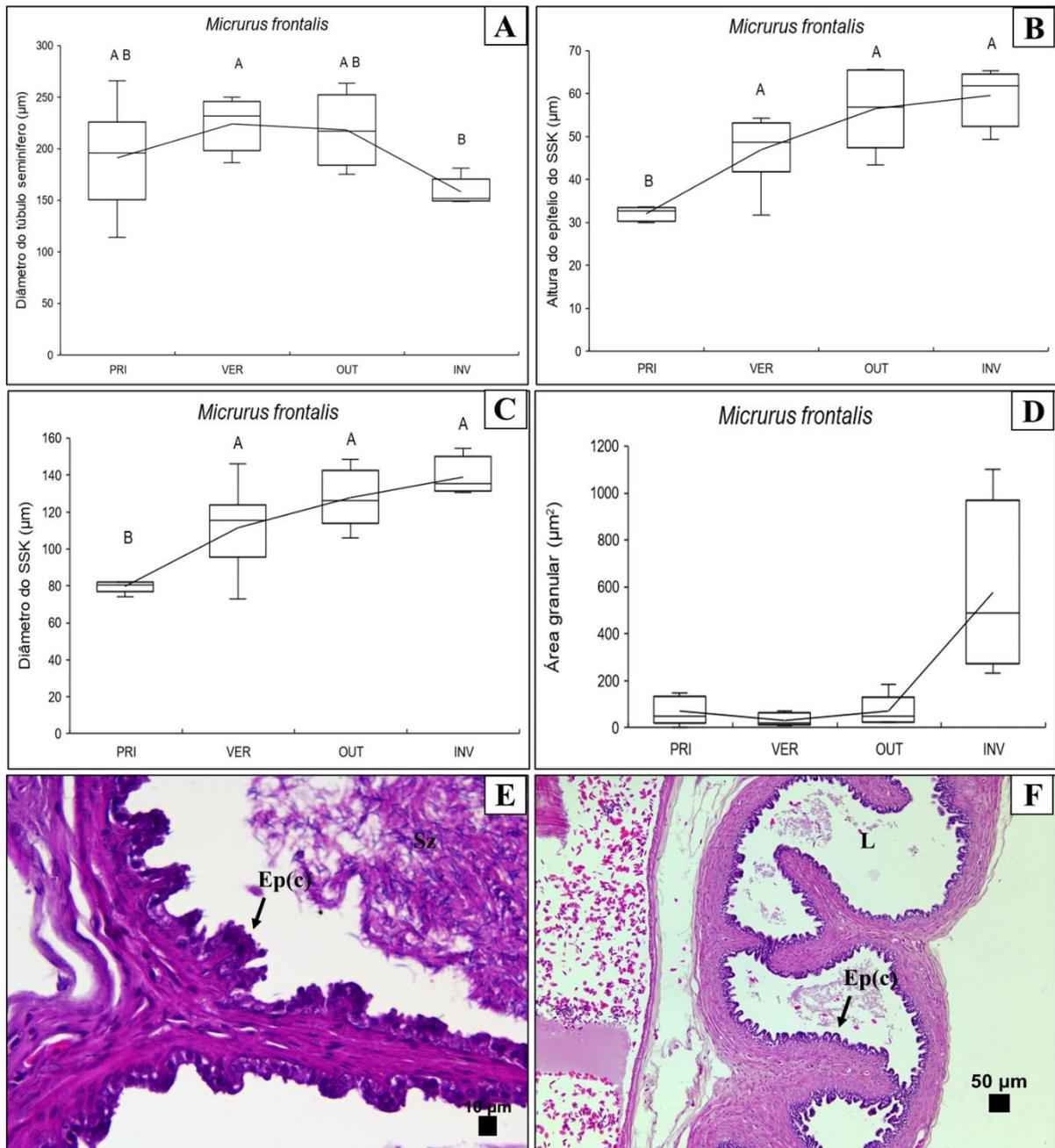


Figura 5. Prancha com os diagramas de caixa, referente as comparações morfométrica entre as estações do ano; e fotomicrografia do ducto deferente. (H/E). Espécie *Micrurus frontalis*. (A-D) morfometria do testículo e rim. (E-F) Região distal do ducto deferente, em evidência o epitélio pseudoestratificado com cristas. Letras diferentes entre os diagramas de caixas (estações), indicam variação significativa entre as médias ( $P < 0,05$ ), na ausência de letras, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ). (Ep(c)) epitélio pseudoestratificado com a formação de criptas. (INV) inverno; (OUT) outono; (PRI) primavera; (VER) verão.

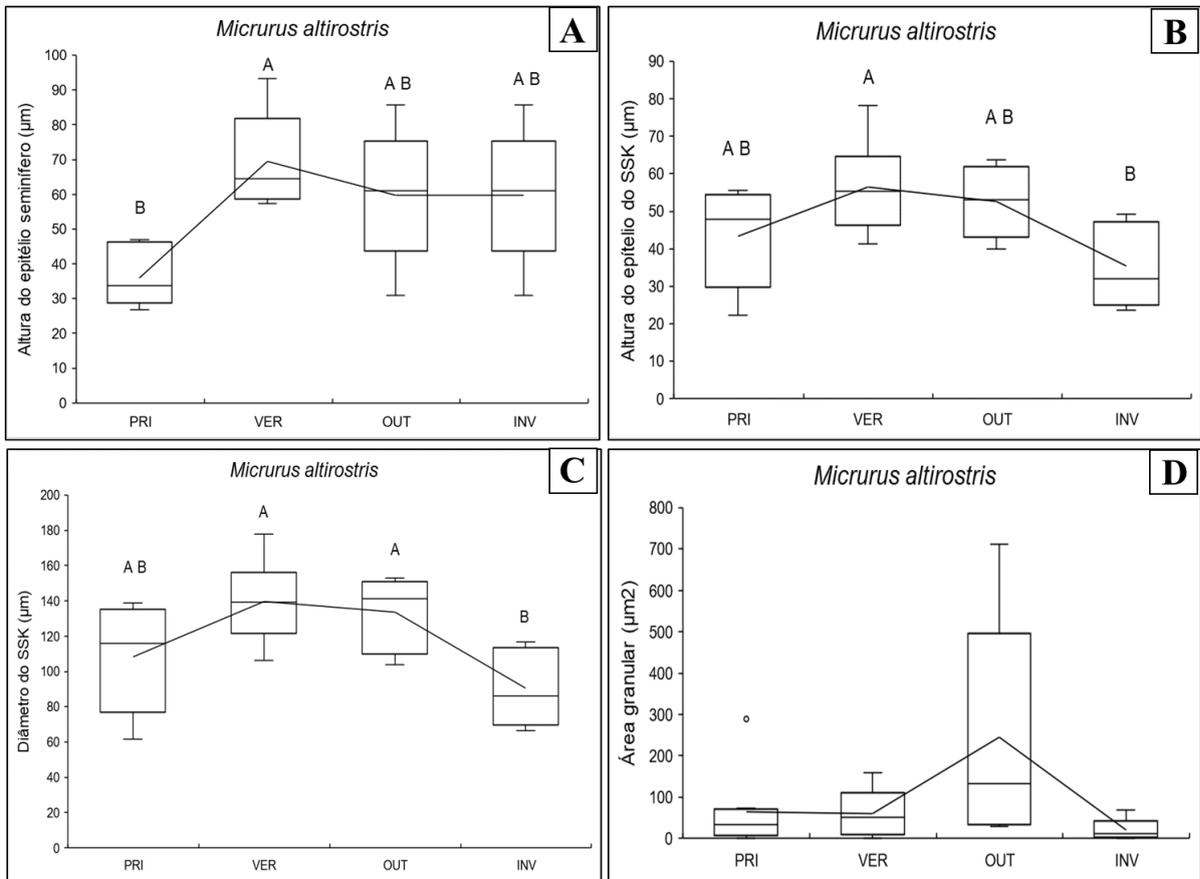


Figura 6. Prancha com os diagramas de caixa, referente as análises de morfometria da espécie *Micrurus altirostris*. (A) testículo, altura do epitélio do túbulo seminífero. (B-D) rim, altura do epitélio, diâmetro e área granular do segmento sexual renal. Letras diferentes entre os diagramas de caixas (estações), indicam variação significativa entre as médias ( $P < 0,05$ ), na ausência de letras, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ). (INV) inverno; (OUT) outono; (PRI) primavera; (VER) verão.

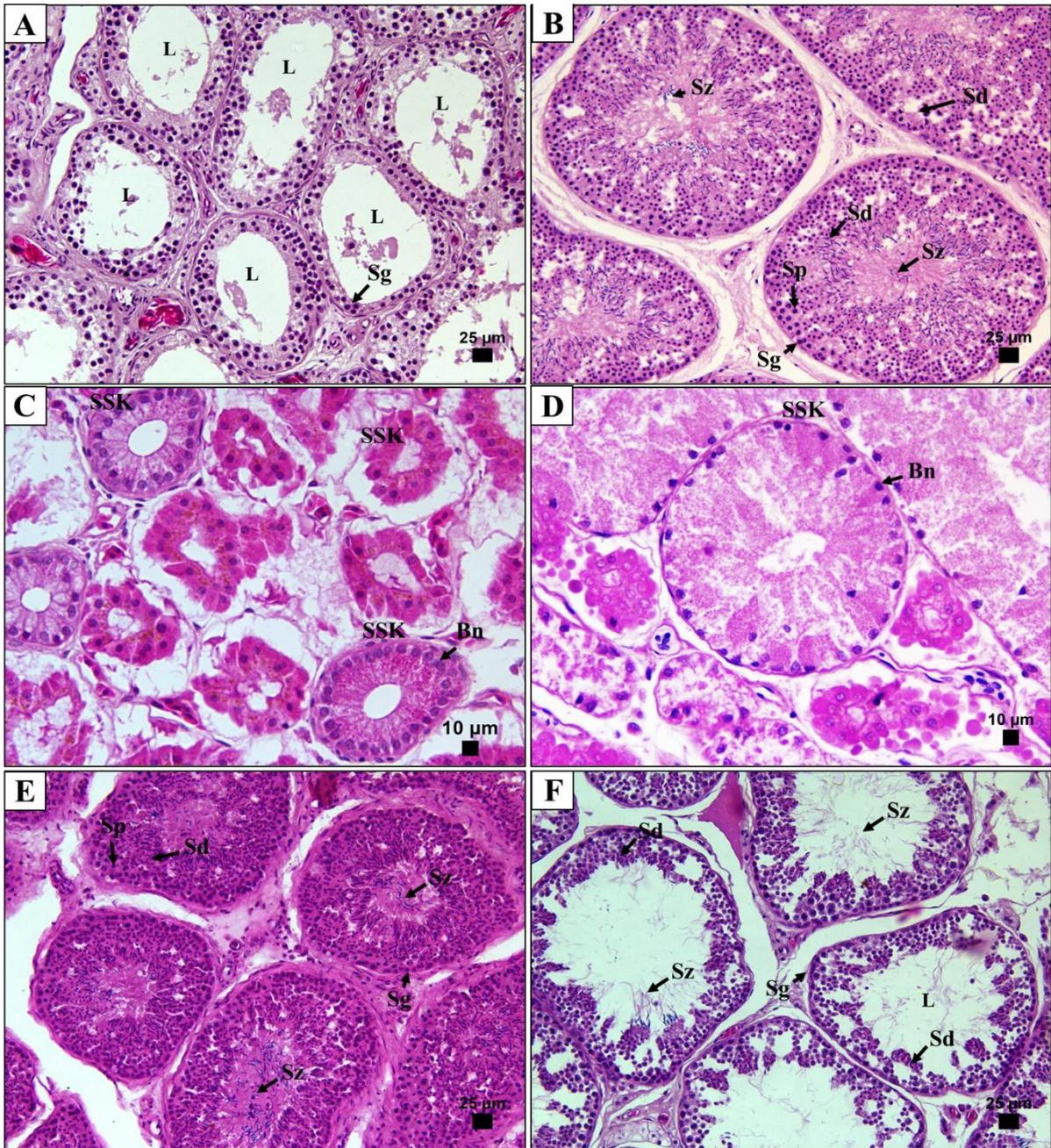


Figura 7. Fotomicrografia do testículo e rim. Cortes histológicos em posição longitudinal. (H/E). (A) túbulos seminíferos em regressão total (estágio I), estação primavera, em *Micrurus altirostris*. (B) túbulo seminífero em espermiogênese (estágio V), estação verão, em *Micrurus altirostris*. (C) segmento sexual renal apresentando estado de hipotrofia (baixa altura do epitélio e diâmetro), estações inverno, em *Micrurus altirostris*. (D) segmento sexual renal exibindo maior altura do epitélio, estação verão, em *Micrurus altirostris*. (E) túbulo seminífero em espermiogênese, estação outono, em *Micrurus surinamensis*. (F) túbulos seminíferos com baixa altura do epitélio indicando transição da espermiogênese para o estágio de início de regressão, estação primavera, em *Micrurus surinamensis*. (Bn) núcleo basal; (Gr) grânulos; (L) lúmen; (Sd) espermatíde; (Sg) espermatogônia; (Sp) espermatócito primário; (SSK) segmento sexual renal; (Sz) espermatozoides.

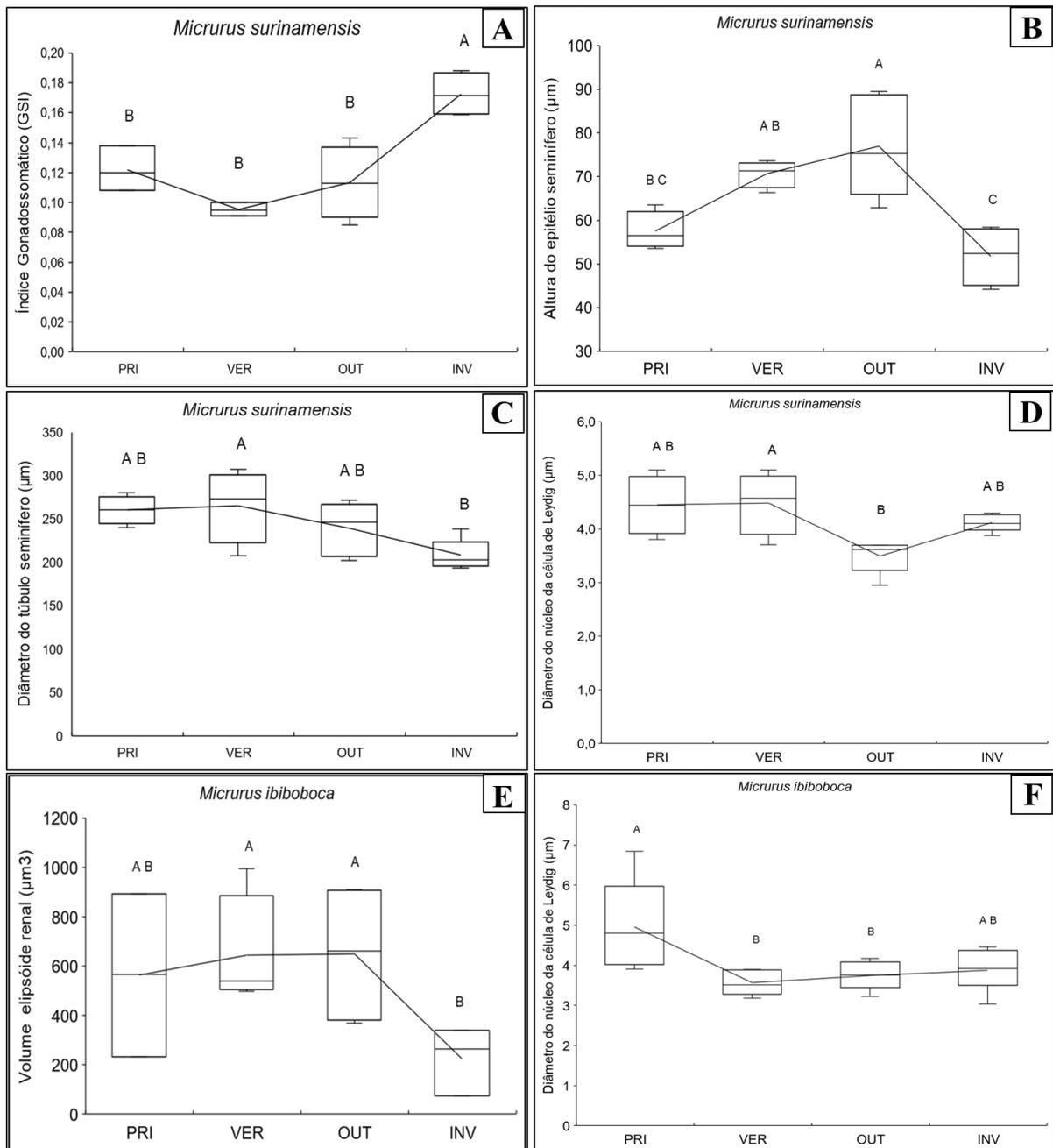


Figura 8. Prancha com os diagramas de caixa, referente as análises biométricas e morfométricas entre as estações. (A) Biometria do testículo, índice gonadossomático em *Micrurus surinamensis*. (B-D) morfometria do testículo, altura do epitélio, diâmetro do túbulo seminífero, e diâmetro do núcleo das células de Leydig, em espécie *Micrurus surinamensis*. (E) biometria do rim, volume renal em *Micrurus ibiboboca*. (F) morfometria do testículo, diâmetro do núcleo das células de Leydig em *Micrurus ibiboboca*. Letras diferentes entre os diagramas de caixas (estações), indicam variação significativa entre as médias ( $P < 0,05$ ), na ausência de letras, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ). (INV) inverno; (OUT) outono; (PRI) primavera; (VER) verão.

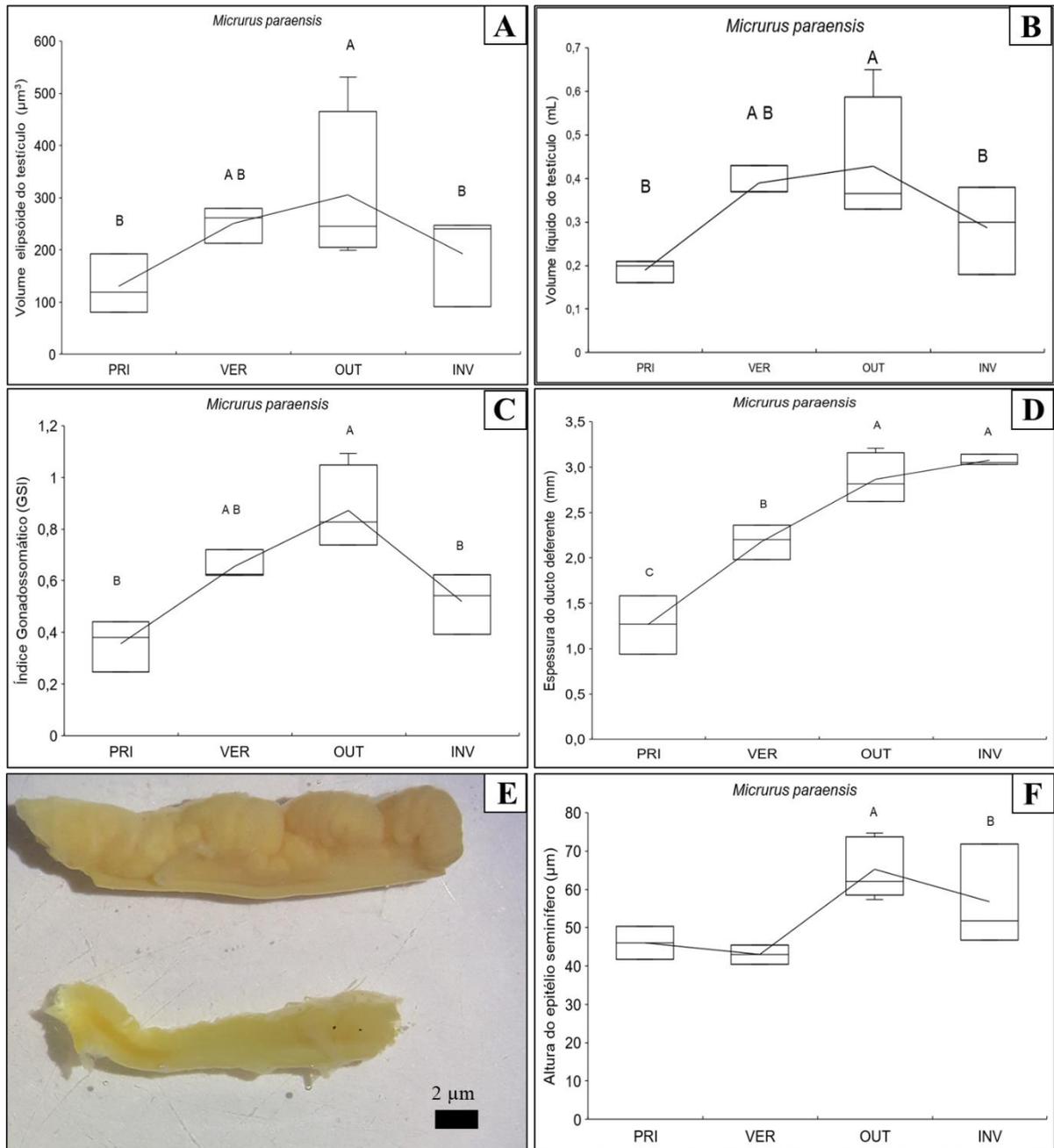


Figura 9. Prancha com os diagramas de caixa, referente as comparações biométricas e morfométricas, foto macroscópica do ducto deferente, espécie *Micrurus paraensis*. (A-B) biometria do testículo, análise da variação do volume. (C) biometria do testículo, índice gonadosomático. (D-E) morfometria do testículo e ducto deferente. (F) Foto macroscópica do ducto deferente, acima ducto proveniente de um espécime coletado no outono e abaixo ducto de um exemplar coletado na primavera. Letras diferentes entre os diagramas de caixas (estações), indicam variação significativa entre as médias ( $P < 0,05$ ), na ausência de letras, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ). (INV) inverno; (OUT) outono; (PRI) primavera; (VER) verão.

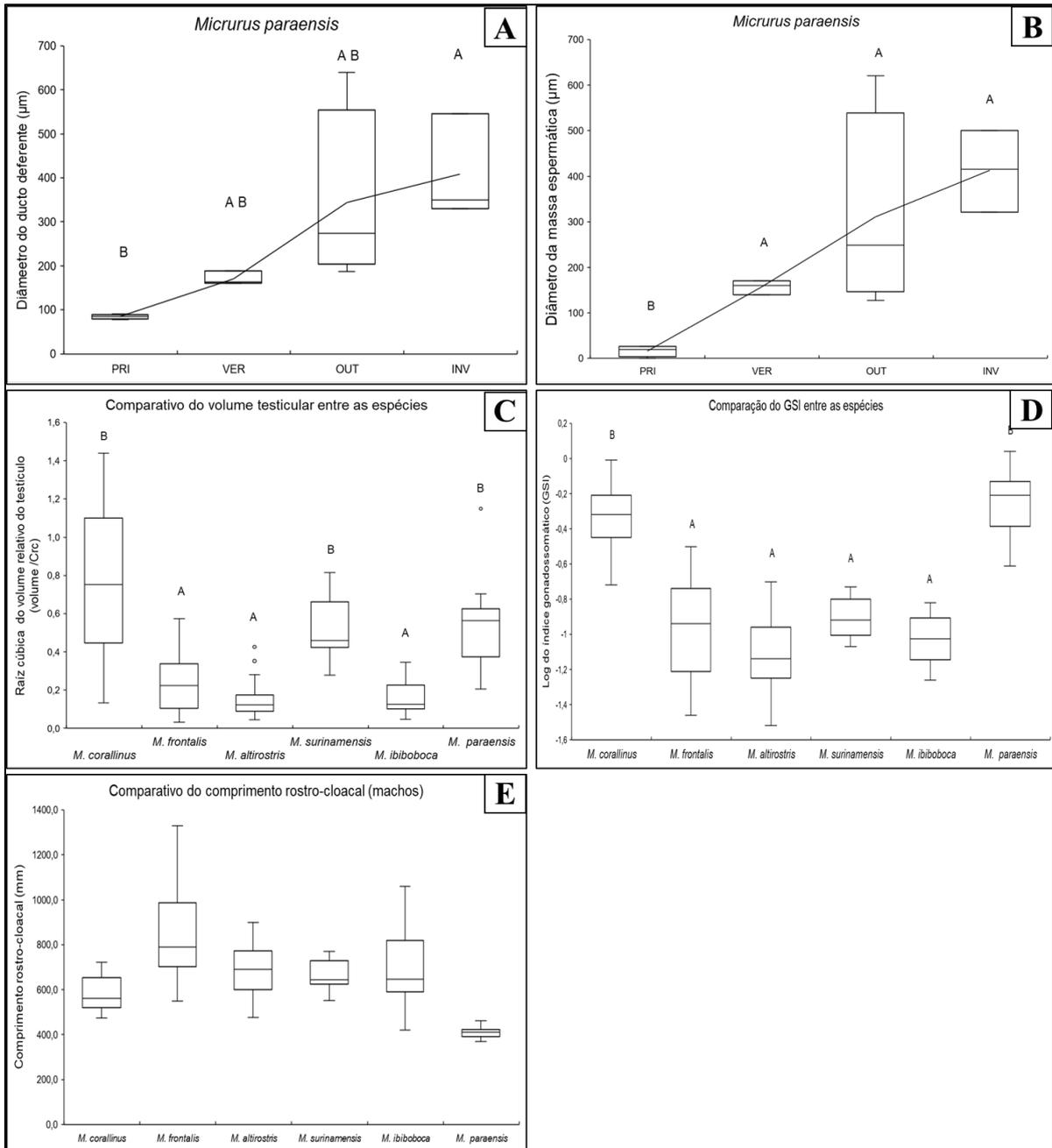


Figura 10. Prancha com os diagramas de caixa, referente as comparações biométricas e morfométricas. (A-B) morfometria do ducto deferente, diâmetro do ducto e da massa espermática presente no lúmen. Espécie *Micrurus paraensis*. (C) comparativo do volume relativo do testículo entre as espécies. (D) comparativo do índice gonadossomático entre as espécies. (E) comparativo do comprimento rostro-cloacal entre as espécies. Letras diferentes entre os diagramas de caixas (estações), indicam variação significativa entre as médias ( $P < 0,05$ ), na ausência de letras, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ). (INV) inverno; (OUT) outono; (PRI) primavera; (VER) verão.

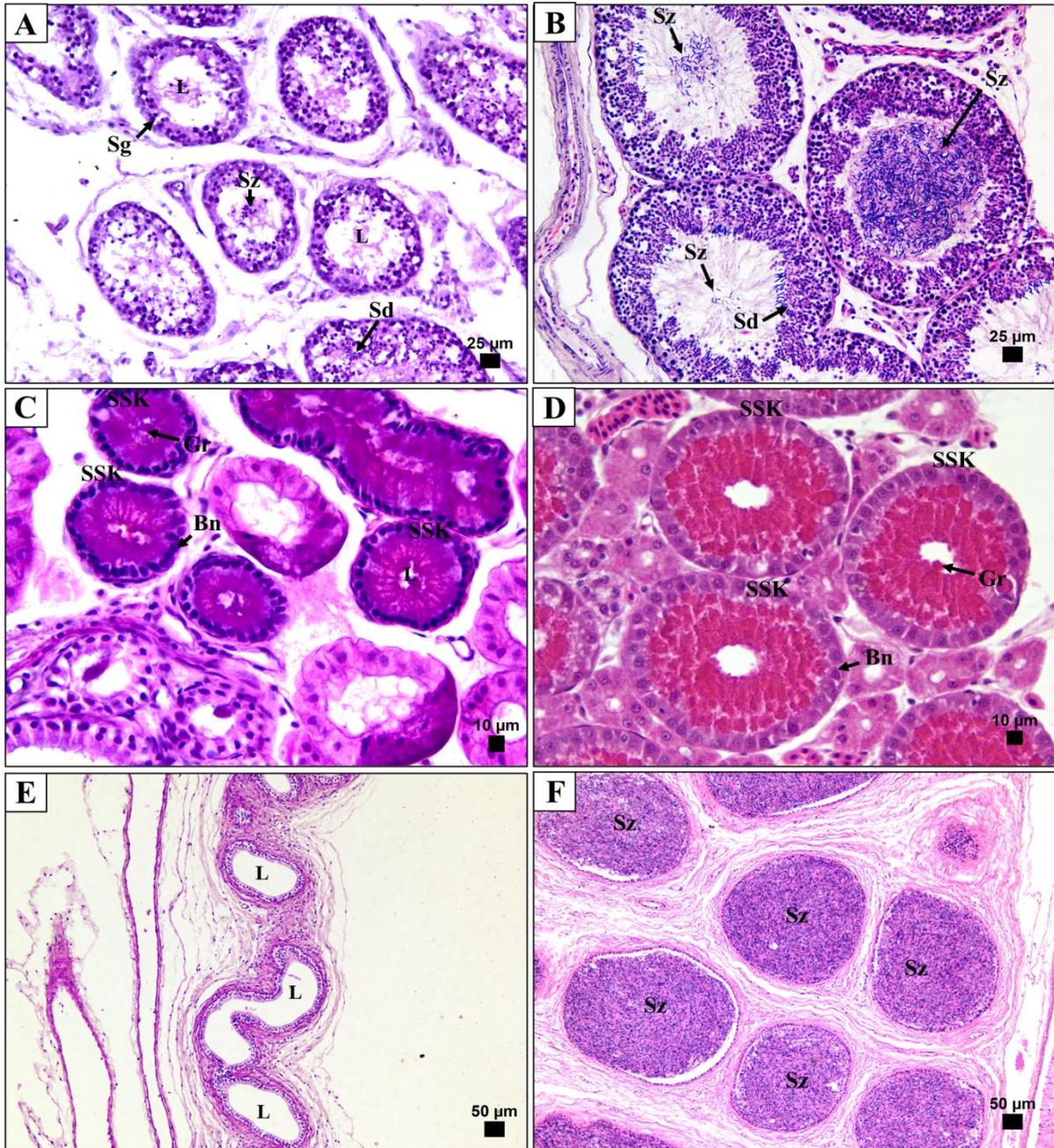


Figura 11. Fotomicrografia do testículo, rim e ducto deferente em *Micrurus paraensis*, com cortes histológicos longitudinais. (H/E). (A) túbulos seminíferos em início de regressão e outros em regressão total, estação primavera. (B) túbulo seminífero em espermiogênese, outono. (C) segmento sexual renal apresentando baixa altura do epitélio e alguns grânulos preenchendo o espaço luminal, estações primavera. (D) segmento sexual renal exibindo o citoplasma do epitélio com grânulos intensamente corados por eosina, estação outono. (E) ducto deferente apresentando lúmen vazio, estação primavera. (F) ducto deferente exibindo espermatozoides estocados no lúmen, estação inverno. (Bn) núcleo basal; (Gr) grânulos; (L) lúmen; (Sd) espermátide; (Sg) espermatogônia; (SSK) segmento sexual renal; (Sz) espermatozoides.

#### 4- DISCUSSÃO

As espécies pertencentes a linhagem BRM, apresentaram alta similaridade no período dos eventos reprodutivos, indicando haver uma conservação das estratégias nesse clado. *Micrurus corallinus* possui o ciclo espermatogênico descontínuo, com a época de alta atividade da fase espermiogênica ocorrendo nas estações outono e inverno (abril-setembro, estiagem). O período da espermiogênese (outono-inverno), também coincidiu com época de máxima hipertrofia do SSK e maior concentração de grânulos no lúmen dessa estrutura. Dessa forma, a alta atividade na produção de espermatozoides pode ser constatada no aumento de concentração de gametas no ducto deferente, ocorrendo a estocagem de espermatozoides no inverno e primavera. A época de acasalamento para *M. corallinus* foi relatada nas estações primavera (Marques, 1996) e verão (Almeida-Santos, Coeti, and Bassi, 2017), essas duas estações coincidem com o período de ovulatório fêmea (Bassi, Coeti, and Almeida-Santos, 2020). Então, com a ocorrência da regressão do epitélio germinativo na primavera, o ducto deferente do macho já apresenta os espermatozoides estocados, em grande quantidade para a época de cópula. Logo, podemos classificá-la como estratégia pré-nupcial (ou associada), pela ocorrência da quiescência do epitélio germinativo e o ciclo para o nível individual é descontínuo e para classificação populacional o ciclo reprodutivo é sazonal semi-sincronizado.

A espécie *M. paraensis* apresenta o ciclo espermatogênico descontínuo, com o período de maior atividade testicular ocorrendo no outono, e a fase da espermiogênese, abrangendo do outono ao inverno (maio-agosto). Essas duas estações, coincidem com a época de maior quantidade de grânulos no lúmen do SSK e máximo acúmulo de espermatozoides no ducto deferente. A estocagem de espermatozoides pode ser caracterizada pela diminuição da atividade testicular até a fase regressão do epitélio germinativo (primavera). Enquanto o ducto

deferente, no inverno e início da primavera, está com os espermatozoides armazenados para a época do acasalamento. Para *M. paraensis* não há registros de cópula na natureza e os dados de história natural são escassos. Na população o ciclo reprodutivo é sazonal semi-sincronizado. De forma geral, as estratégias reprodutivas observadas nos machos de *M. paraensis* apresentam-se com muita semelhança ao de *M. corallinus*, com a ocorrência dos eventos reprodutivos no mesmo período (entre as espécies). A diferença de maior relevância seria a diminuição da concentração de espermatozoides no lúmen do ducto deferente ocorrendo na primavera. Enquanto em *M. corallinus*, a redução de espermatozoides ocorre no verão. Assim, possivelmente a estação de acasalamento em *M. paraensis* ocorra no inverno e primavera.

Na linhagem BRT as espécies analisadas apresentaram variação entre os ciclos, e algumas espécies exibiram um período de regressão testicular, sendo diferente do ciclo assazonal para o grupo, como relatado por Marques et al. (2013). A espécie *Micrurus frontalis* possui o ciclo espermatogênico contínuo, o período da fase espermatogênica ocorre do verão ao inverno. Não constatamos a ocorrência de regressão do epitélio germinativo, porém, no final do inverno e ao longo da primavera, há uma diminuição da atividade testicular, coincidindo com diminuição na hipertrofia no epitélio do SSK. No verão, o túbulo seminífero apresenta a fase da recrudescência (estágio II e III) indicando uma retomada na atividade testicular. Para a espécie não há registro de acasalamento na literatura, entretanto, o combate entre machos ocorre no outono (Almeida-Santos, Coeti, and Bassi, 2021). Como o ritual de combate é um comportamento que está diretamente ligado à época do acasalamento, por preceder a cópula (Carpenter, 1984; Madsen and Shine, 1993), a estação do outono pode ser caracterizada como período de acasalamento para *M. frontalis*. No ducto deferente, não houve variação significativa na concentração dos espermatozoides ao longo das estações. A presença da estrutura da *ampulla*, neste caso, pode não estar relacionada a função de estocagem, pelo

fato de não haver quiescência do epitélio germinativo, apenas uma redução na produção durante a primavera. A estrutura da *ampulla* apresenta graus de complexidade na arquitetura do epitélio (Trauth and Sever, 2011a), sendo reflexo de outras funções descritas em serpentes, como: atividade secretória de carboidratos neutros, em *Agkistrodon piscivorus* (Siegel et al., 2009b); endocitose e fagocitose (e.g., espermatozoides mortos), em *Pantherophis obsoletus* (Akbarsha et al., 2005). Assim, trabalhos que analisem comparativamente a micro-anatomia do ducto deferente (*ampulla*) em *Micrurus*, com microscopia eletrônica de transmissão e varredura são necessários para melhor compreensão da funcionalidade dessa estrutura em *M. frontalis* e em outras espécies do gênero.

*Micrurus altirostris* possui o ciclo espermatogênico descontínuo, com o período de regressão total do epitélio germinativo, ocorrendo do final do inverno ao início da primavera. E retomada da atividade espermiogênica no verão (com os estágios IV e V). Entre as estações verão e outono, temos o período de máxima hipertrofia do SSK, coincidindo com a época de maior concentração de grânulos no lúmen. Esses resultados, indicam maior concentração da atividade reprodutiva em apenas duas estações (verão-outono). Para *M. altirostris* não há registros de cópula na natureza documentado, apenas o relato do comportamento de combate entre machos nas estações verão, outono e inverno (Almeida-Santos, Coeti, and Bassi, 2021). Entretanto, Bassi (dados não publicados) constatam a presença de espermatozoides no útero aglandular das fêmeas de *M. altirostris*, indicando a ocorrência de cópula recente, em espécimes coletados nas quatro estações do ano, sendo a maior porcentagem nas estações primavera e inverno. Assim, *M. altirostris* possui como estratégia um extenso período de acasalamento, com a possibilidade da cópula ocorrer em qualquer época do ano. A existência de um amplo período de acasalamento indica um alto investimento reprodutivo da espécie (Siegel and Ford, 1987; Greene, 1997). E indiretamente sinaliza que pode haver diferentes períodos de cópulas entre populações, assim como identificado por Graham et al. (2008) em

*Agkistrodon piscivorus*, e comentado por Aldridge et al. (2020). De forma geral, a espécie *M. altirostris* possui na categoria individual como ciclo descontínuo, e para classificação populacional o ciclo é sazonal semi-sincronizado. O ducto deferente não exhibe variações de concentração de espermatozoides, indicando não haver período de picos de atividade espermática. Entretanto, a estocagem de espermatozoides tende a acontecer no período da regressão total do epitélio germinativo, no qual há o armazenamento espermatozoides no ducto deferente (Goldberg and Parker, 1975), em *M. altirostris* a pausa na produção de gametas ocorre entre o inverno e primavera, e os machos com essa capacidade conseguem realizar a cópula neste período também.

A espécie *Micrurus surinamensis* possui a classificação para o nível individual, de ciclo espermatogênico contínuo, e constatamos que o período de espermiogênese é amplo, de fevereiro até meados de outubro. Entre o final do inverno e a primavera, observamos alguns túbulos seminíferos em transição para o início de regressão (estágio VI), indicando uma diminuição da atividade espermatogênica nesse período. No ducto deferente não houve variação da concentração de espermatozoides ao longo do ano. Não há registros de cópula ou combate entre machos na literatura. Entretanto, Bassi (dados não publicados) descreve a ocorrência de espermatozoides na região do útero aglandular em fêmeas coletadas nas estações primavera e inverno, indicando cópula recente, assim consideramos essas estações como época de acasalamento para a espécie. O período de espermiogênese coincide com a época do acasalamento indicando uma condição pré-nupcial, para categoria populacional, *M. surinamensis* possui o ciclo sazonal semi-sincronizado.

*Micrurus ibiboboca* possui o ciclo espermatogênico descontínuo, e para classificação populacional como ciclo sazonal semi-sincronizado. O período de espermiogênese ocorre do verão ao inverno (dezembro-setembro). Dentro do ciclo verificamos que do final do inverno até meados da primavera, há uma diminuição da atividade testicular, sendo caracterizado pela

regressão total do epitélio germinativo. O volume renal apresenta uma diminuição do volume no inverno, coincidindo com a queda na atividade espermiogênica. E o ducto deferente não exibiu variação ao longo do ano. A espécie não possui registro de cópula na literatura. Em análises realizadas no oviduto das fêmeas de *M. ibiboboca*, alguns espécimes possuíam espermatozoides no lúmen do útero aglandular, no verão e no inverno, indicando cópula recente (Bassi, dados não publicados). O comportamento de combate foi registrado ocorrendo no outono, inverno e primavera (Coeti, dados não publicados). Logo, podemos concluir que *M. ibiboboca* possui um amplo período de acasalamento, no qual a cópula pode acontecer em qualquer época do ano.

Dentro das estratégias analisadas, constatamos alguns padrões no grupo *Micrurus*, todas as espécies mostraram algum nível de redução da atividade espermatogênica ocorrendo na primavera. As espécies *M. frontalis* e *M. surinamensis* apresentam o ciclo reprodutivo contínuo, porém também exibem uma diminuição da espermatogênese na estação da primavera. Enquanto as espécies *M. corallinus*, *M. ibiboboca*, *M. altirostris* e *M. paraensis* apresentam a fase de regressão total do epitélio germinativo na primavera.

As espécies *M. paraensis* (BRM) e *M. surinamensis* (BRT) estão distribuídas no bioma Amazônia, ambas expostas a características climáticas análogas. Porém, exibem estratégias reprodutivas diferentes entre si, como: tipo de ciclo reprodutivo (duração e intensidade de atividade da fase espermatogênica), atividade do SSK e capacidade de estocar espermatozoides. *M. surinamensis* apresenta maior investimento reprodutivo por manter um extenso período de espermiogênese. Como diferencial, o hábito semiaquático proporciona condições de maior obtenção de energia com uma alimentação rica em peixes (Santos et al., 2005). Assim, essa condição permite uma melhora no *fitness* reprodutivo e conseqüentemente no potencial espermatogênico de *M. surinamensis*. Enquanto, *M. paraensis* apresenta como estratégia um período de espermiogênese de menor duração, porém nesse período existe uma

alta intensidade na produção de espermatozoides, sendo evidenciado aumento considerável na concentração de espermatozoides no ducto deferente.

Evolutivamente parece haver uma conservação das estratégias reprodutivas dentro de cada linhagem, no grupo BRM, *M. corallinus* e *M. paraensis* exibem o ciclo reprodutivo semelhante a espécie *M. fulvius* (Jackson and Franz, 1981) e *M. tener* (Quinn, 1979), esses dados revelam que essas espécies mesmo estando em regiões climaticamente diferentes, os eventos reprodutivos apresentam o mesmo padrão de duração e tendem acontecer na mesma época do ano. Todas as espécies apresentaram a característica da regressão testicular dentro do ciclo, e o período da fase de espermiogênese (estágios IV-V) de aproximadamente duas estações, havendo então uma tendência a um ciclo espermatogênico de curta duração.

A espermatogênese de alta intensidade em *M. corallinus* e *M. paraensis* é corroborada, pois mesmo apresentando as menores médias de comprimento rostro-cloacal (comparado com as espécies BRT), ambas as espécies exibem os maiores valores de volume testicular relativo e índice gonadossomático entre as seis espécies estudadas. Isso reflete na estocagem de armazenamento elevado, sendo perceptível macroscopicamente no ducto deferente, em *M. corallinus* (Almeida-Santos, Pizzatto, and Marques, 2006) e *M. paraensis* (presente trabalho) associado a época do acasalamento.

Nas espécies do grupo BRT, *M. frontalis*, *M. surinamensis* e *M. ibiboboca*, a análise interespecífica mostra uma tendência ao padrão de ciclo espermatogênico de longa duração, assim, a energia alocada para produção de espermatozoides é distribuída por novo meses, apenas *M. altirostris* difere desse padrão apresentando um ciclo reprodutivo curto. Outras espécies do grupo de tríades como *M. lemniscatus*, *M. carvalhoi* e *M. hemprichii* (Almeida-Santos, Coeti, and Bassi, 2021)

A espécie *M. altirostris* possui uma área de distribuição mais restrita, sendo locais com maior latitude, como: sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina (Nogueira et al., 2019);

diferido bastante das outras espécies de tríades. A serpente *Echivanthera cyanopleura* possui praticamente a mesma região de distribuição, e exibe o padrão de ciclo espermatogênico de curta duração com duas estações (Zanella and Cechin, 2010), semelhante à *M. altirostris*. Diferente de outros biomas brasileiros, o Pampa exibe temperaturas abaixo de zero no inverno (Mendonça and Danni-Oliveira, 2007). E baixas temperaturas podem afetar diretamente o metabolismo e a atividade das serpentes (Lillywhite, 1987). Entretanto, a maioria das espécies de *Micrurus* possuem o hábito semi-fossorial, a capacidade se enterrar e encontrar um local de fuga de temperaturas extremas, possa auxiliar na termorregulação. Estudos que trabalhem o comportamento de animais fossoriais visando a termorregulação, são necessários para melhor entendimento do uso do substrato pelo grupo *Micrurus*.

#### 4.1 - Maturidade sexual

Nas espécies analisadas, a média do Crc nos machos adultos de *M. corallinus* e *M. paraensis* (pertencentes a linhagem BRM) são menores, quando comparada as espécies da linhagem BRT. A presença do comportamento de combate na linhagem BRT, possivelmente tenha levado a seleção de machos maiores no grupo (Marques, Pizzatto, and Almeida-Santos, 2013), portanto, proporcionalmente esperasse que a média de Crc para o espécime juvenil alcançar a maturidade sexual, também seja maior. Essa proporcionalidade é observada em *M. frontalis* e *M. surinamensis*. Entretanto, as espécies *M. altirostris* e *M. ibiboboca* não seguiram esse padrão, apresentam espécimes que atingem a maturidade com menor comprimento rostro-cloacal, sendo semelhantes as espécies do grupo BRM (clado que não apresenta combate). O investimento estratégico da espécie, no qual sua prole (machos) atinja a fase adulta com maior rapidez (menor Crc), seria vantajoso por aumentar o número de machos reprodutivos, conseqüentemente, de oportunidades que a fêmea pode copular. Nos elapídeos, a obtenção precoce da maturidade é observada em diversas espécies do grupo,

algumas espécies como *Hemiaspis signata* e *H. daemelli*, com aproximadamente 300 mm de Crc (em 12 meses, pós nascimento), entram na fase adulta (Shine, 1978). Dados de taxa de crescimento em espécies de coral verdadeira relacionados a maturidade, são praticamente inexistentes na literatura e de grande relevância, para melhor compreensão da estratégias de maturidade precoce ou tardia no grupo. Com o presente trabalho identificamos uma diferença substancial na maturidade sexual dentro do grupo BRT, indicando uma possível estratégia reprodutiva no clado.

#### 4.2 - Conclusão

No clado das espécies mônades, *M. corallinus* e *M. paraensis* apresentaram o padrão de ciclo descontínuo, com o período de espermiogênese de duas estações (outono e inverno), sendo o mesmo período de maior atividade do SSK. Dentro desse período há uma intensa produção de espermatozoides nas estações com menores índices pluviométricos e com temperaturas mais amenas. Essa estratégia permite a estocagem de espermatozoides com armazenamento elevado, possibilitando múltiplas cópulas aos machos, na época de acasalamento. Nas espécies da linhagem BRT verificamos dois padrões de ciclo reprodutivo, o ciclo contínuo, em *M. frontalis* e *M. surinamensis*, sem pausa na produção dos espermatozoides. E o ciclo descontínuo, evidenciado em *M. ibiboboca* e *M. altirostris*, no qual ocorre uma pausa na produção de espermatozoides. As espécies *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. surinamensis* possuem amplo período de espermiogênese como estratégia. Assim, a energia investida na produção de espermatozoides é distribuída por aproximadamente nove meses, com produção constante na espermiogênese (sem picos). Essa estratégia de longo período de espermiogênese coincide com a atividade de hipertrofia do SSK (em *M. frontalis* e *M. surinamensis*), e conseqüentemente esse resultado reflete na concentração constante de espermatozoides no ducto deferente, entre as estações. A

maturidade sexual é alcançada com menor comprimento rostro-cloacal nas espécies mônades, porém *M. altirostris* e *M. ibiboboca*, também alcançam a maturidade com Crc menor de 500 mm. A linhagem BRM apresenta conservação das estratégias reprodutivas, pela evidência de espécie em diferentes biomas exibirem o mesmo tipo de estratégias e a mesma época de ocorrência dos eventos reprodutivos. Enquanto o grupo das espécies tríades, exibe dois padrões de estratégias, constatado pela maior variabilidade do período de ocorrência e duração dos eventos reprodutivos. O presente trabalho apresenta novas informações sobre as estratégias reprodutivas existentes nas espécies do gênero *Micrurus*. Futuros trabalhos são necessários para: aprofundar a compreensão da relação entre as condições ambientais (abióticas: variações temperatura e umidade / bióticas: alimentação) e a reprodução, no grupo BRT; investigar a atividade do ducto deferente e da estrutura da *ampulla* (microscopia eletrônica) na conservação dos espermatozoides durante a estocagem; e o papel dos grânulos de secreção provenientes do SSK, na manutenção dos espermatozoides.

## REFERÊNCIAS

- Ab'Sáber, A.N. (2007): Os Domínios de Natureza no Brasil. Potencialidades Paisagísticas. Ateliê Editorial.
- 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. *J. Morphol.* **266**: 94–111.
- 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*, p. 477–510. Aldridge, R.D., Sever, D.M., Eds. Science Publishers,.
- Aldridge, R.D., Siegel, D.S., Goldberg, S.R., Pyron, R.A. (2020): Seasonal timing of spermatogenesis and mating in Squamates: A reinterpretation. *Copeia* **108**: 231.
- Almeida-Santos, S.M., Braz, H.B., Santos, L.C., Sueiro, L.R., Barros, V.A., Rojas, C.A., Kasperoviczus, K.N. (2014): Biologia reprodutiva de serpentes : recomendações para a coleta e análise de dados. *Herpetol. Bras.* **3**: 14–24.
- Almeida-Santos, S.M., Coeti, R.Z., Bassi, E.A. (2017): *Micrurus corallinus* (coralsnake). reproduction. *Herpetol. Rev.* **48**: 862.
- 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. *Herpetol. J.* **16**: 371–376.
- Almeida-Santos, S.M., Coeti, R.Z., Bassi, E.A. (2021): Reproductive strategies of new world coralsnakes. In: *Advances in Coralsake Biology*, p. 335–352. Silva Jr., N.J. Da, Aird, S.D., Prudente, A.L.D.C., Eds. Goiânia, Puc Goiás,.
- 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. *Herpetol. J.* **24**: 41–49.
- Bassi, E.A. (2016): A influência de variações climáticas no ciclo reprodutivo de corais verdadeiras *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis*. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita filho' (UNESP/IBILCE).
- Bassi, E.A., Coeti, R.Z., Almeida-Santos, S.M. De (2020): Reproductive cycle and sperm storage of female coral snakes, *Micrurus corallinus* and *Micrurus frontalis*. *Amphib. Reptil.* **41**: 13–27.
- Bucarechi, F., Capitani, E.M. De, Vieira, R.J., Rodrigues, C.K., Zannin, M., Silva, N.J. Da, Casais-E-Silva, L.L., Hyslop, S. (2016): Coral snake bites (*Micrurus* spp.) in Brazil: A review of literature reports. *Clin. Toxicol.* **54**: 222–234.
- Campbell, J.A., Lamar, W.W. (2004): *The venomous reptiles of the western hemisphere*. Ithaca, United States, Cornell University Press.
- Carpenter, C.C. (1984): Dominance in skanes. In: *Vertebrate Ecology and Systematics*, p. 195–202.
- Costa, H.C., Bérnils, R.S. (2018): Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: lista de espécies. *Rev. Herpetol. Brasileira* **7**: 11–57.

- Coutinho, L.M. (2016): *Biomias brasileiros*. São Paulo, Oficina de textos.
- Fox, H. (1977): Urinogenital System. In: *Biology of the Reptilia Volume 6. Morphology*, p. 81–96. Gans, C., Parsons, T.S., Eds. London and New York., Academic Press.,
- Goldberg, S.R., Parker, W.S. (1975): Seasonal testicular histology of the Colubrid snakes, *Masticophis taeniatus* and *Pituophis melanoleucus*. *Herpetologica* **31**: 317–322.
- Graham, S.P., Earley, R.L., Hoss, S.K., Schuett, G.W., Grober, M.S. (2008): The reproductive biology of male cottonmouths (*Agkistrodon piscivorus*): Do plasma steroid hormones predict the mating season? *Gen. Comp. Endocrinol.* **159**: 226–235.
- Greene, H.W. (1997): *Snakes: the evolution of mystery in nature*. London, England.
- Jackson, D.R., Franz, R. (1981): Ecology of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) in northern peninsular Florida. *Herpetologica* **37**: 213–228.
- Junqueira, L.C.U. (1995): Histology revisited—Technical improvement promoted by the use of hydrophilic resin embedding. *Ciênc Cult* **47**: 92–95.
- Lillywhite, H.B. (1987): Temperature, energetics and physiological ecology. In: *Snakes: Ecology and Evolutionary Biology*, p. 422–477. Seigel, R.A., Collings, J.T., Novak, S.S., Eds. New York, USA, MacMillan Publishing.,
- Loebens, L., Cechin, S.Z., Theis, T.F., Moura, L.B., Almeida-Santos, S.M. (2016): Reproductive biology of *Philodryas patagoniensis* (Snakes: Dipsadidae) in south Brazil: male reproductive cycle. *Acta Zool.* 1–11.
- Madsen, T., Shine, R. (1993): Temporal variability in sexual selection acting on reproductive tactics and body size in male snakes. *Am. Nat.* **141**: 167–171.
- Marques, O.A.V. (1996): Reproduction, seasonal activity and growth of the coral snakes, *Micrurus corallinus* (Elapidae), in the southeastern Atlantic forest in Brazil. *Amphibia-Reptilia* **17**: 277–285.
- Marques, O.A.V., Pizzatto, L., Almeida-Santos, S.M. (2013): Reproductive strategies of new world coral snakes, genus *Micrurus*. *Herpetologica* **69**: 58–66.
- Mathies, T. (2011): Reproductive cycles of tropical snakes. In: *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*, p. 511–550. Aldridge, R.D., Sever, D.M., Eds. Science Publishers.,
- Mendonça, F., Danni-Oliveira, I. moresco (2007): *Climatologia Noções Basicas e Climas do Brasil*. Oficina de textos.
- Nogueira, C.C., Argôlo, A.J.S., Arzamendia, V., Azevedo, J.A., Barbo, F.E., Bérnils, R.S., Bolochio, B.E., Borges-Martins, M., Brasil-Godinho, M., Braz, H., Buononato, M.A., Cisneros-Heredia, D.F., Colli, G.R., Costa, H.C., Franco, F.L., Giraud, A., Gonzalez, R.C., Guedes, T., Hoogmoed, M.S., Marques, O.A.V., Montingelli, G.G., Passos, P., Prudente, A.L.C., Rivas, G.A., Sanchez, P.M., Serrano, F.C., Silva, N.J., Strüssmann, C., Vieira-Alencar, J.P.S., Zaher, H., Sawaya, R.J., Martins, M. (2019): Atlas of Brazilian Snakes: Verified Point-Locality Maps to Mitigate the Wallacean Shortfall in a Megadiverse Snake Fauna. *South Am. J. Herpetol.* **14**: 1–274.
- Pizzatto, L., Cantor, M., Oliveira, J.L. de, Marques, O. a. V., Capovilla, V., Martins, M. (2008): Reproductive Ecology of Dipsadine Snakes, With Emphasis on South American Species. *Herpetologica* **64**: 168–179.

- Pleguezuelos, J.M., Feriche, M. (1999): Reproductive ecology of the Horseshoe whip snake (*Coluber hippocrepis*) in the Iberian Peninsula. *J. Herpetol.* **33**: 202–207.
- Quinn, H.R. (1979): Reproduction and growth of the Texas coral snake (*Micrurus fulvius tener*). *Copeia* **1979**: 453–463.
- 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. *J. Morphol.* **274**: 215–228.
- Roze, J.A. (1996): Coral Snakes of the Americas - Biology, identification, and venoms. Florida, Krieger Publishing Company.
- Santos, X., Llorente, G.A., Feriche, M., Pleguezuelos, J.M., Casals, F., Sostoa, A. de (2005): Food availability induces geographic variation in reproductive timing of an aquatic oviparous snake (*Natrix maura*). *Amphibia-Reptilia* **26**: 183–191.
- Scherle, W. (1970): A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* **26**: 57.
- Seigel, R.A., Ford, N.B. (1987): Reproductive ecology. In: Snakes: Ecology and Evolutionary Biology, p. 210–252. Seigel, R.A., Collins, J.T., Novak, S.S., Eds. New York, USA, Macmillan,.
- Sever, D.M. (2004): Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). IV. Occurrence of an ampulla ductus deferentis. *J. Morphol.* **262**: 714–730.
- Shine, R. (1977): Reproduction in Elapid snakes I. Testicular cycles and mating seasons. *Aust. J. Zool.* **25**: 647–653.
- Shine, R. (1978): Growth Rates and Sexual Maturation in Six Species of Australian Elapid Snakes. *Herpetologica* **34**: 73–79.
- Siegel, D.S., Sever, D.M., Rheubert, J.L., Gribbins, K.M. (2009): Reproductive biology of *Agkistrodon piscivorus* Lacépède (Squamata, Serpentes, Viperidae, Crotalinae). *Herpetol. Monogr.* 74–107.
- Silva Jr., N.J. Da (2016): As cobras corais do Brasil biologia, taxonomia, venenos e envenenamentos. Goiânia, Puc Goiás.
- Silva Jr., N.J. Da, Buononato, M.A., Feitosa, D.T. (2016): As cobras-corais do novo mundo. In: As cobras corais do Brasil biologia, taxonomia e envenenamento, p. 47–78. Silva Jr., N.J. Da, Ed. Goiânia, Editora da Puc Goiás,.
- Silva Jr., N.J. Da, Sites Jr., J.W. (1999): Revision of the *Micrurus frontalis* complex (Serpentes: Elapidae). *Herpetol. Monogr.* **13**: 142–194.
- Slowinski, J.B. (1995): A Phylogenetic Analysis of the New World Coral Snakes (Elapidae: *Leptomicrurus*, *Micruroides*, and *Micrurus*) Based on Allozymic and Morphological Characters. *J. Herpetol.* **29**: 325–338.
- Trauth, S.E., Sever, D.M. (2011a): Male urogenital ducts and cloacal anatomy. In: Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes, p. 411–475. Aldridge, R.D., Sever, D.M., Eds. Queensland, Science Publishers,.
- Trauth, S.E., Sever, D.M. (2011b): Male Urogenital Ducts and Cloacal Anatomy. In:

Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes, p. 411–475. Aldridge, R.D., Sever, D.M., Eds. Enfield, NH 03748, USA, Science Publishers,.

Zaher, H., Grazziotin, F., Prudente, A.L.D.C., Silva Jr., N.J. Da (2016): Origem e evolução dos Elapideos e das cobras-corais. In: As cobras corais do Brasil biologia, taxonomia e envenenamento, p. 25–45. Editora da Puc Goiás,.

Zanella, N., Cechin, S.Z. (2010): Reproductive biology of *Echianthera cyanopleura* (Serpentes: Dipsadidae) in southern Brazil. *Zoologia* **27**: 30–34.

### 3. ARTIGO II

#### Estratégias e ciclo reprodutivo das fêmeas em espécies do gênero *Micrurus*

**Erick Augusto Bassi<sup>1,2,3\*</sup>, Classius De Oliveira<sup>2,3</sup>, Selma Maria de Almeida-Santos<sup>1,3</sup>**

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

2- Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Departamento de Biologia, Campus São José do Rio Preto, 2265, Rua Cristóvão Colombo, 15054-000, SP, Brasil.

3- Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Campus São José do Rio Preto, SP, Brasil.

\*Corresponding author: Erick Augusto Bassi; Postal address: Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, Brasil. E-mail address: erick.bassi@unesp.br; Phone number (+55) 11 3384-7727.

## RESUMO

As cobras corais do gênero *Micrurus* apresentam duas linhagens filogenéticas que exibem estratégias reprodutivas diferentes. A linhagem BRT apresentou dois padrões de estratégia de ciclo reprodutivo sazonal, o de curta duração abrangendo duas estações em *M. altirostris* e *M. ibiboboca*. E o padrão de ciclo extenso em *M. surinamensis* que exibiu diminuição dos caracteres reprodutivos no oviduto apenas no inverno. O grupo BRM apresentou maior conservação do padrão de ciclo reprodutivo, *M. paraensis* possui um ciclo sazonal de curta duração. As fêmeas de *Micrurus* exibiram em comum, a primavera como uma estação reprodutiva e como período ovulatório, ou seja, a época de eclosão dos filhotes está direcionada para ocorrer no verão (período mais quente do ano). A estratégia de estocagem de espermatozoides está presente nas espécies do gênero *Micrurus*, independente do ciclo estar ou não associado a época de cópula. E pela primeira vez na família Elapidae foi comprovada a estocagem de espermatozoides em receptáculos especializados (SSr) em dois pontos no oviduto, infundíbulo posterior e útero aglandular, caracterizando a estocagem de longa e de curta duração. Além disso, identificamos a ocorrência da estocagem de espermatozoides pela estrutura do UMC em *Micrurus*. A estratégia de ampla época de acasalamento foi evidenciada em *M. altirostris*, ocorrendo em qualquer estação do ano. Para *M. surinamensis* e *M. ibiboboca* apresentaram um curto período de cópula, com duas estações de duração. Desta forma, comparativamente o grupo BRT apresentou maior flexibilidade nas estratégias reprodutivas de padrão de ciclo e época de acasalamento. Enquanto o grupo BRM, apresentou maior conservação e similaridade do padrão de estratégias reprodutivas.

*Palavras-chave:* Receptáculos de estocagem, cobra-coral, vitelogênese.

## 1– INTRODUÇÃO

Estratégia reprodutiva são modificações adaptativas que o indivíduo (ou população) adota devido a uma condição do meio, sendo selecionada a tática que visa proporcionar uma melhora no potencial reprodutivo frente a uma competição, de forma a balancear o custo energético com o sucesso reprodutivo (Angelini and Ghiara, 1984). O ciclo reprodutivo é composto pela ocorrência de diversos eventos reprodutivos como espermatogênese, vitelogênese/ovulação, estocagem de espermatozoide, estação de acasalamento, ritual de combate entre machos, oviposição e maturidade sexual (Almeida-Santos et al., 2014). O período de ocorrência dos eventos reprodutivos, conforme o tempo de duração, sendo longo (ou estendida) ou de curto, pode ser considerada como uma estratégia reprodutiva (Shine, 2003; Mathies, 2011).

As espécies de cobra-coral verdadeira estão distribuídas no novo mundo e dentro da Família Elapidae, existem três gêneros que compõem as cobras, *Micrurus*, *Micruroides*, *Leptomicrurus* (Campbell and Lamar, 2004; Silva Jr., Buononato, and Feitosa, 2016). Atualmente são reconhecidas 82 espécies distribuídas no novo mundo, destas o gênero *Micrurus* abriga 77 espécies (Silva Jr., Buononato, and Feitosa, 2016) com 36 espécies distribuídas pelo Brasil, sendo 7 destas endêmicas (Costa and Bérnils, 2018). E diferente do grupo Viperidae, os dados reprodutivos existentes para as cobras corais verdadeiras são escassas, e a maioria dos trabalhos existentes não apresentam dados mais refinados de histologia (Bassi, Coeti, and Almeida-Santos, 2020).

As fêmeas das cobras corais, assim como em outras serpentes, possuem o sistema reprodutor composto por dois ovários alongados voltados para o eixo mediano e um par de ovidutos dispostos lateralmente aos ovários (Bassi et al., 2018). Cada ovário é sustentado na parede dorsal do corpo pelo mesovarium e o oviduto pelo mesotubarium (Quinn, 1979). O oviduto pode apresentar diferentes nomeações e subdivisões anatômicas (Rojas, Barros, and

Almeida-Santos, 2017), sendo a mais usual a proposta por Siegel et al. (2011), dividindo o oviduto em: infundíbulo anterior e posterior, útero glandular e aglandular, e bolsa vaginal.

O oviduto possui diversas funções, antes e durante toda a condução do ovo em seu interior, como a síntese e provisão de albúmen, muco (lubrificação), formação das membranas da casca, fornecimento de cálcio para a calcificação do ovo e em algumas espécies a estocagem de espermatozoides (Blackburn, 1998; Girling, 2002). Dentro destas funções, há uma regionalização de cada etapa do processo, até a consumação da oviposição (Fox, 1977; Blackburn, 1998), devido a todas essas funções e modificações é possível delimitar os períodos do ciclo reprodutivo (Siegel and Sever, 2008; Bassi, Coeti, and Almeida-Santos, 2020). A habilidade da fêmea em armazenar espermatozoides em túbulos, criptas ou receptáculos de estocagem (SSr) presentes oviduto, foi descrita em diversas espécies de vertebrados (Eckstut et al., 2009; Holt and Fazeli, 2016). Nas serpentes, há a comprovação desta estratégia nas famílias Viperidae (Almeida-Santos and Salomão, 1997, 2002), Dipsadidae (Rojas et al., 2015) e Natricidae (Siegel et al., 2011). A estocagem dos espermatozoides no oviduto permite uma dissociação do período de cópula com o período de ovulação (Barros, Rojas, and Almeida-Santos, 2014), existindo assim, diversas hipóteses do funcionamento, das vantagens existentes na estocagem e de como esse mecanismo evoluiu nas serpentes (Duvall et al., 1992; Eckstut et al., 2009).

Marques et al. (2013) delinearão as estratégias reprodutivas presentes em duas linhagens das cobras corais, sendo constatado que havia diferenças nos padrões reprodutivos dentro do grupo. O grupo BRT apresenta dimorfismo sexual, dos machos serem maiores que a fêmea, presença do comportamento de combate entre os machos, fêmeas com ciclo reprodutivo amplo, sendo necessário a estocagem de espermatozoides. Enquanto o grupo BRM teria dimorfismo sexual, de fêmeas maiores que os machos, ausência do comportamento de combate e vitelogênese em sincronia com a época do acasalamento, não ocorrendo

estocagem nas fêmeas.

No presente trabalho analisaremos o ciclo reprodutivo existentes nas espécies dos grupos BRM e BRT, apresentando uma abordagem de análise macroscópica e histológica. Para delimitar o período reprodutivo das fêmeas, classificamos o tipo de ciclo reprodutivo existente em cada espécie e aprofundamos a compreensão das estratégias reprodutivas adotadas. Além disso, verificamos a ocorrência da estratégia de estocagem de espermatozoides, no oviduto da fêmea.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Espécies e espécimes analisados

As espécies utilizadas foram escolhidas pela proximidade filogenética (Slowinski, 1995; Zaher et al., 2016), pela característica de distribuição, cada espécie pertencente a um bioma, e pelo número amostral disponível nas coleções biológicas para empréstimo (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição e agrupamento das espécies de cobra coral analisadas, conforme os dados de data e local de coleta. **BRM**: linhagem com o padrão de anéis arranjados em mônades; **BRT**: padrão de anéis em tríades.

Espécie	Linhagem	Bioma	Primavera	Verão	Outono	Inverno	Total
<i>Micrurus altirostris</i>	BRT	Pampa	12	6	6	6	36
<i>Micrurus ibiboboca</i>	BRT	Caatinga	6	4	4	5	19
<i>Micrurus surinamensis</i>	BRT	Amazônia	3	3	2	3	11
<i>Micrurus paraensis</i>	BRM	Amazônia	5	6	7	5	23

Os espécimes analisados são provenientes das seguintes coleções biológicas: Instituto Butantan (IB), Universidade Estadual de Campinas (ZUEC), Museu de História Natural Capão da Imbuia (MHNCI), Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ), Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (MCNR/PUC-MG), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA),

Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), Fundação Zoobotânica (MCN/FZB), Instituto Nacional da Mata Atlântica (INMA), Universidade Federal de Pernambuco (CHUFPE), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e Universidade Federal do Acre (UFAC).

## **2.2 -Ciclo reprodutivo**

As fêmeas de cada espécie foram separadas e agrupadas conforme as estações do ano, para o hemisfério sul (austral). Os espécimes foram analisados utilizando-se dados de data e local de coleta, disponibilizado pelas coleções biológicas. A nomenclatura anatômica utilizada para denominação das porções do oviduto, foi feita com base na proposta de Siegel et al. (2011). Desta forma, seguimos a nomeação: infundíbulo anterior, infundíbulo posterior, útero glandular, útero aglandular e bolsa vaginal.

O ciclo reprodutivo foi caracterizado pelas variáveis operacionais: biometria dos folículos vitelogênicos, análise qualitativa do oviduto e pela morfometria das glândulas exócrinas. Pela biometria, foram feitas medições do comprimento do maior folículo vitelogênico presente no ovário ou de ovos alocados no oviduto, utilizando um paquímetro digital com medição realizada em milímetros (Almeida-Santos et al., 2014). Os dados histológicos foram usados para análise qualitativa (Bassi, Coeti, and Almeida-Santos, 2020), avaliando a variação dos caracteres reprodutivos presentes no oviduto, caracterizando as modificações ao longo do ciclo, em fase reprodutiva e não reprodutiva (Tabela 2). Os caracteres reprodutivos examinados no oviduto foram: área glandular das glândulas exócrinas, no qual indicam os períodos de máxima hipertrofia ou hipotrofia. E na morfometria, realizamos comparações entre espécimes das quatro estações, analisando a variação do estado

glandular em hipotrofia e hipertrofia, usando a medida de área glandular (útero glandular)(Loebens et al., 2017).

Tabela 2. Caracteres reprodutivos analisados no oviduto, para caracterização da fase reprodutiva. **(A)** infundíbulo posterior; **(B)** útero glandular; **(C)** útero aglandular.

Epitélio luminal (conformação) <sup>A, B, C</sup>	Glândulas exócrinas (estado) <sup>B</sup>	Secreção no lúmen <sup>A, B, C</sup>	Fase
Cúbico sem cílios	Glândulas hipotrofiadas	Ausente ou em poucos pontos	Não reprodutivo
Colunar com cílios em algumas regiões	Glândulas hipotrofiadas e hipertrofiadas	Em diversos pontos	Reprodutivo
Colunar com cílios	Glândulas hipertrofiadas	Em quase toda extensão	Reprodutivo

### 2.3 -Área de distribuição das espécies

Dos exemplares analisados no presente trabalho, temos a distribuição dos espécimes no mapa (Fig. 1).

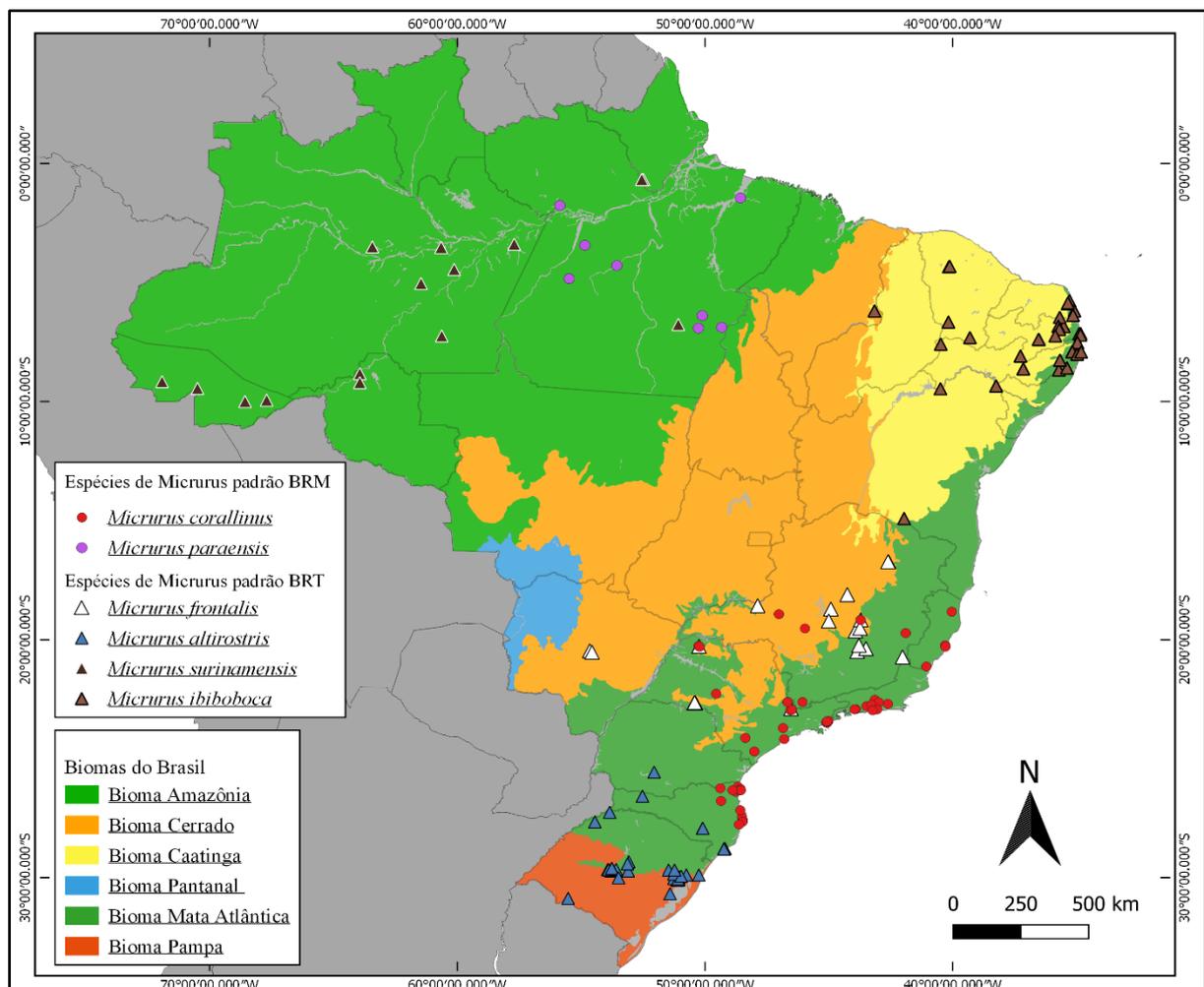


Figura 1. Mapa de biomas do Brasil com os limites da federação, apresentando a distribuição das espécies de *Micrurus*, referentes as linhagens BRM e BRT analisadas no presente estudo.

A espécie *M. altirostris* está presente nos biomas da Mata Atlântica e em maior concentração no Pampa (Nogueira et al., 2019). As condições climáticas dos biomas Mata Atlântica e Pampa são semelhantes, porém pela localização em maior latitude da região do Pampa, a temperatura média da estação do inverno de aproximadamente 10-12 °C, e nos dias mais frios a temperatura relativa pode chegar abaixo de zero (Mendonça and Danni-Oliveira, 2007). As espécies *M. surinamensis* e *M. paraensis* então distribuídas no bioma Amazônia (Silva Jr., 2016), região que exhibe um intenso regime pluviométrico com a média anual 2.145 mm de chuvas e um curto período de seca no inverno, entretanto há uma homogeneidade térmica ao longo do ano, com temperatura média 28,2°C (Mendonça and Danni-Oliveira, 2007).

A espécie *M. ibiboboca* possui a principal distribuição dentro do bioma da Caatinga e região de restinga litorânea (Nogueira et al., 2019). A Caatinga apresenta o tipo climático equatorial, no qual exhibe alta sazonalidade no regime de chuvas, sendo com cinco meses de estiagem e sete meses com maior pluviosidade (Ab'Sáber, 2007). Dependendo da localidade pode haver considerável diferença no regime de chuvas de 2.300 mm (e.g., S. Luís do Maranhão) até 620 mm anuais (e.g., Campos Sales).

#### **2.4- Biometria**

Para cada espécime coletamos o comprimento rostro-cloacal (Crc) em milímetros, utilizando uma fita métrica. Após a dissecação, registramos o comprimento do maior folículo vitelogênico presente no ovário ou ovo no oviduto, independente do lado (direito ou esquerdo). As medições foram feitas com o uso de paquímetro digital. Posteriormente, para classificação de folículos em estado de vitelogênese primária (V1) ou secundária (V2), plotamos os dados num gráfico de dispersão para análise, conforme proposto por Almeida-Santos et al. (2014).

## **2.5 -Histologia**

Para análise histológica, foram coletadas amostras teciduais, de cada espécime, infundíbulo posterior, útero glandular, útero aglandular e bolsa vaginal. Após o processo de desidratação alcóolica crescente, o material tecidual foi incluído em parafina, posteriormente emblocado, e assim, passando pelo processo usual de histologia (Junqueira, 1995). Os cortes histológicos tiveram a espessura de 5-7  $\mu\text{m}$ , preferencialmente na posição longitudinal para melhor avaliação da área tecidual. A coloração básica utilizada na análise histológica foi hematoxilina e eosina (H/E). Para análise das lâminas histológicas, usamos o microscópio Leica DM4 B com câmera DMC 4500 acoplada.

A estrutura de receptáculo de estocagem, localizada no infundíbulo posterior e útero aglandular, possui a denominação da glândula tubular ciliada (TCG). Na análise qualitativa, diferenciamos à nomeação da estrutura quanto ao armazenamento de espermatozoides. As estruturas que possuíam espermatozoides armazenados, designamos como receptáculo de estocagem de espermatozoides (SSr) e quando não exibiam espermatozoides no lúmen nomeamos como TCG.

## **2.6 -Histoquímica**

Para a técnica de histoquímica utilizamos os reagentes ácido periódico-Schiff (PAS), para identificação de carboidratos neutros, azul de Alcian (AB) pH 2,5 para identificação de glicosaminoglicanos carboxilados ou polissacarídeos ácidos; e o azul brilhante de Coomassie (CB) para identificação de proteínas. O protocolo de histoquímica utilizado o laboratório multiusuário da Universidade federal de Santa Catarina (UFSC), sendo adaptado com a inclusão da contra-coloração com hematoxilina (Bassi, Coeti, and Almeida-Santos, 2020), permitindo melhor delimitação das estruturas celulares presentes no epitélio e lâmina própria.

## 2.7 - Maturidade sexual

A maturidade sexual nas fêmeas foi caracterizada pela presença de folículos ovarianos em vitelogênese secundária, evidência de corpo lúteo no ovário ou presença de espermatozoides no lúmen uterino (ou vaginal) (Shine, 1977a; Barros, Rojas, and Almeida-Santos, 2014b; de Souza and Almeida-Santos, 2020). Desta forma, utilizamos à medida do comprimento rostro-cloacal da menor fêmea, que apresentou qualquer um dos caracteres listados acima, como parâmetro para determinação da maturidade reprodutiva.

## 2.8 -Morfometria glandular

A região do útero glandular de cada espécime foi analisada em relação ao estado de atividade das glândulas exócrinas, comparando as fêmeas entre as quatro estações do ano. Para a morfometria realizamos medições da área glandular de 50 glândulas de cada exemplar. O padrão seguido foi o registro de 5 fotos randômicas do útero glandular, de cada foto, foram coletadas 10 medidas de área glandular ( $\mu\text{m}^2$ ). Todas as medições foram realizadas no *software Image Pro Plus 6.0*. Para a análise morfométrica da área glandular entre as estações, o método estatístico utilizado foi a análise de variância (ANOVA), havendo diferença significativa foi complementado pelo teste *post-hoc Tukey*, tendo como diferenças significativa  $P < 0,005$ . Todos os dados foram testados quanto a normalidade de distribuição.

## 2.9 - Estratégias reprodutivas analisadas

As estratégias reprodutivas nas fêmeas foram examinadas com base na composição de alguns eventos reprodutivos, como: vitelogênese, caracteres de atividade reprodutivos no oviduto, atividade das glândulas exócrinas (útero glandular), época de acasalamento e período de estocagem de espermatozoides. Para cada estratégia reprodutiva, utilizamos o agrupamento de algumas variáveis operacionais (e.g., biometria, morfometria e análise qualitativa), para

permitir a avaliação do tipo de estratégia adotada em cada espécie (Tabela 3).

Tabela 3. Composição das estratégias reprodutivas e delineamento das medidas coletadas para análise. **(CM)** comprimento do maior folículo; **(SSr)** receptáculo de estocagem de espermatozoides; **(UMT)** torção muscular uterina.

<b>Estratégias reprodutivas</b>	<b>Variações</b>	<b>Medidas coletadas</b>	
Periodicidade do ciclo reprodutivo	<b>Ciclo curto</b> (duração até 7 meses)	<b>Biometria</b> C.M. folículo vitelogênico/ovo  <b>Morfometria</b> Área glandular	
	<b>Ciclo extenso</b> (acima 7 meses)	<b>Análise qualitativa</b> Infundíbulo posterior Útero glandular Útero Aglandular Vagina	
	Estocagem de espermatozoides	<b>Curta duração - SSr</b> (Infundíbulo posterior)	<b>Análise qualitativa</b> Infundíbulo posterior Útero Aglandular Vagina
		<b>Longa duração – SSr</b> (útero aglandular)	
Época de acasalamento	<b>Presença UMT*</b>		
	<b>Curta</b> (duas estações)	<b>Análise qualitativa</b> Útero aglandular e Vagina	
	<b>Extensa</b> (3 ou mais estações)		

### 3 – RESULTADOS

#### 3.1 - Ciclo reprodutivo

A espécie *M. altirostris* apresentou folículos V2 ocorrendo de setembro a dezembro, sendo 57,1% na primavera e 42,9% ocorrendo no inverno. Os ovos no oviduto foram evidenciados na estação da primavera (outubro-dezembro; Fig. 2). Pela análise qualitativa realizada no oviduto, observamos que na primavera, o epitélio do infundíbulo posterior apresentava-se colunar ciliado por quase toda a extensão (Fig. 3A). Na região inicial do infundíbulo posterior (porção de transição região anterior-posterior), o epitélio apresentava

células piramidais e com núcleo basal, característico de células secretoras de muco, principalmente nas pontuações próximas as glândulas tubulares ciliadas (TCG). Nessa região de transição, evidenciamos espermatozoides armazenados nos receptáculos de estocagem (SSr). E ao longo de todo o infundíbulo posterior, o lúmen exibia diversos pontos com secreção (Fig. 3B). No útero glandular, o epitélio exibia conformação colunar ciliada, porém muitos espécimes também apresentavam regiões do epitélio pseudoestratificadas (Fig. 3C). No tecido conjuntivo as glândulas estavam hipertrofiadas e em grande concentração e no lúmen diversos pontos de secreção foram observados (Fig. 3D). No útero aglandular o epitélio era colunar ciliado por quase toda a sua extensão, na lâmina própria diversas fêmeas exibiam TCGs e SSr com grânulos armazenados (Fig. 3E, F), sendo a primavera a estação com maior concentração destas estruturas.

No verão evidenciamos um retrocesso de alguns caracteres reprodutivos, no infundíbulo posterior o epitélio mantinha a conformação colunar ciliada, e alta concentração de TCG no tecido conjuntivo. Porém, não observamos células secretoras no epitélio, e verificamos baixa quantidade de secreção no lúmen infundibular (Fig. 4A). No útero glandular constatamos as glândulas exócrinas em estado de hipotrofia, o epitélio exibia o estado cúbico sem cílios (Fig. 4B). No útero aglandular poucos TCGs foram observados no tecido conjuntivo, o epitélio exibia a conformação colunar ciliada e havia pouca secreção no lúmen (Fig. 4C). No outono verificamos que a maioria das fêmeas apresentavam no infundíbulo posterior, o epitélio cúbico ciliado e pouca secreção no lúmen. No útero aglandular observamos algumas fêmeas mantendo as glândulas em estado de hipotrofia, e outras já exibiam a condição de hipertrofia. O epitélio cúbico sem cílios e poucos pontos com secreção no lúmen. O útero aglandular exibia a variação entre os espécimes de cúbico ciliado e colunar ciliado, e diversos pontos com secreção foram evidenciados no lúmen. No inverno as fêmeas apresentavam o infundíbulo posterior com o epitélio colunar ciliado, células

secretoras compondo o epitélio, diversos pontos com secreção no lúmen (Fig. 4D) e algumas fêmeas exibiram SSr e TCG na lâmina própria. O útero glandular apresentava o estado de hipertrofia das glândulas exócrinas, epitélio colunar ciliado e secreção luminal por quase extensão do útero (Fig. 4E). E o útero aglandular exibia o epitélio colunar ciliado e um aumento significativo de secreção no espaço luminal em toda sua extensão (Fig. 4F). Pela morfometria da área glandular em *Micrurus altirostris*, verificamos uma diferença significativa entre as estações (Anova,  $F = 7,05$ ;  $P = 0,003^*$ ; Fig. 2), os espécimes coletados no inverno apresentaram maior média da área glandular, quando comparado ao verão (*post-hoc Tukey*,  $P = 0,013^*$ ) e ao outono (*post-hoc Tukey*,  $P = 0,005^*$ ).

A espécie *Micrurus ibiboboca* apresentou espécimes com folículos em V2 ocorrendo de setembro a dezembro, sendo aproximadamente 33,3% no inverno e 66,7% na primavera (Fig. 2). Não constatamos espécimes com ovos no oviduto. Na primavera evidenciamos o infundíbulo posterior exibindo o epitélio colunar ciliado, e próximo as regiões que possuíam TCGs observamos células epiteliais apresentando cílios com maior comprimento (Fig. 5A). O lúmen infundibular exibia baixa quantidade de secreção. No útero glandular o epitélio era colunar sem cílios, as glândulas exócrinas estavam em estado de hipertrofia, em todos os espécimes desta estação (Fig. 5B). O útero aglandular apresentava o epitélio pseudoestratificado com cílios (Fig. 5C), na lâmina própria de alguns indivíduos, constatamos a presença de TCGs exibindo grânulos fragmentados no lúmen (Fig. 5D), ao longo de todo útero (glandular e aglandular) diversos pontos de secreção no lúmen.

No verão, o infundíbulo posterior exibia o epitélio cúbico sem cílios em quase toda sua extensão, apenas em algumas porções o epitélio exibia cílios (Fig. 5D), o lúmen infundibular apresentava poucas regiões com secreção. No útero glandular observamos a maioria das fêmeas com glândulas exócrinas em hipotrofia (Fig. 5E) e outras, exibindo tanto glândulas hipertrofia quanto em hipotrofia, o epitélio estava com a conformação cúbico sem cílios e

havia poucos pontos de secreção no lúmen. No útero aglandular o epitélio era cúbico ciliado e no tecido conjuntivo as fêmeas apresentavam SSR e TCGs com grânulos (Fig. 5F).

No outono as fêmeas exibiam no infundíbulo posterior a conformação do epitélio cúbico com cílios, observamos uma baixa presença de TCGs (sem grânulos no lúmen) no tecido conjuntivo (Fig. 6A). No útero glandular verificamos o epitélio cúbico sem cílios, as glândulas exócrinas na maioria das fêmeas em estado de hipotrofia, apenas alguns espécimes apresentavam dois estados glandulares, de hipertrofia e outras glândulas em hipotrofia (Fig. 6B). O útero aglandular possuía o epitélio colunar ciliado, a lâmina própria quase ausente de TCG e o lúmen sem secreção (Fig. 6C).

No inverno evidenciamos as fêmeas exibindo o epitélio com a conformação colunar ciliada e poucos pontos com secreção no lúmen (Fig. 6D). No útero glandular havia grande concentração de glândulas em estado de hipertrofia, diversos pontos com secreção na região luminal e epitélio colunar sem cílios (Fig. 6E). No útero aglandular constatamos o epitélio colunar ciliado, alta concentração de TCGs armazenando grânulos fragmentados, a presença receptáculos de estocagem com espermatozoides e o lúmen exibindo diversos pontos com secreção (Fig. 6F). Pela morfometria da área glandular, constatamos uma variação significativa entre as estações (Anova,  $F = 6,93$ ;  $P = 0,006^*$ ; Fig. 2), ocorrendo uma diminuição significativa da área no verão, ao ser comparado com a primavera (*post-hoc Tukey*,  $P = 0,049^*$ ) e com o inverno (*post-hoc Tukey*,  $P = 0,016^*$ ). Assim, a espécie *M. ibiboboca* apresentou o período de maior atividade ovidutal nas estações primavera e inverno, indicando época reprodutiva nesse período.

A espécie *Micrurus surinamensis* apresentou espécimes exibindo folículos em V2 de abril a outubro (outono, final do inverno e primavera), sendo aproximadamente 33,3% para cada uma das três estações. A presença de ovos no oviduto foi constatada nos meses de outubro a dezembro (primavera; Fig. 7). Na primavera as fêmeas exibiam um epitélio colunar

ciliado por quase toda extensão do oviduto (Fig. 8A), especificamente no infundíbulo posterior, observamos células secretoras, com o formato prismático, citoplasma pouco corado por hematoxilina e núcleo na posição basal. No útero glandular havia grande concentração de glândulas em estado de hipertrofia no tecido conjuntivo (Fig. 8B). No útero aglandular constatamos algumas fêmeas com SSr e a maioria das fêmeas exibindo TCGs com grânulos interiorizados (Fig. 8C). Além disso, o lúmen apresentava diversos pontos com secreção.

No verão constatamos a maioria das fêmeas exibindo os caracteres reprodutivos similares a estação primavera, no infundíbulo posterior o epitélio apresentava-se colunar ciliado, verificamos diversos TCGs sem grânulos na lâmina própria e pouca secreção luminal no infundíbulo (Fig. 8D). No útero glandular evidenciamos alta concentração de glândulas exócrinas na lâmina própria, em estado de hipertrofia; diversos pontos de secreção no lúmen e o epitélio estava com a conformação colunar ciliada (Fig. 8E). No útero aglandular o epitélio possuía a arquitetura estratificada ciliada, e o lúmen exibia diversos pontos de secreção ao longo de toda sua extensão (Fig. 8F).

No outono os espécimes apresentavam no infundíbulo, a conformação colunar ciliada do epitélio, a presença de células secretoras ativas, e diversos pontos com secreção no lúmen (Fig. 9A). No útero glandular o epitélio ainda apresentava a condição colunar ciliado, no tecido conjuntivo as glândulas exócrinas estavam em estado de hipertrofia, porém verificamos uma redução de secreção no lúmen uterino (Fig. 9B). No útero aglandular havia pouca secreção no lúmen, e baixa quantidade de TCG (Fig. 9C).

Na estação do inverno o epitélio exibia a conformação cúbico ciliada, ao longo de todo infundíbulo posterior e útero glandular; na área luminal dessas duas porções do oviduto, verificamos poucos pontos de secreção (Fig. 9D, E). No útero glandular maioria das fêmeas apresentaram as glândulas exócrinas em estado de hipotrofia (Fig. 9E), algumas fêmeas exibiam glândulas em hipertrofia e outras em hipotrofia. No útero aglandular verificamos a

maior quantidade de espécimes exibindo a lâmina própria com alta quantidade de TCGs com grânulos densos e compactos em seu interior (Fig. 9F). A camada epitelial apresentava a conformação colunar ciliada, e em algumas porções o epitélio estava estratificado. Na análise comparativa da área glandular não houve diferença significativa entre as médias das estações (Anova,  $F = 1,63$ ;  $P = 0,229$ ; Fig. 7).

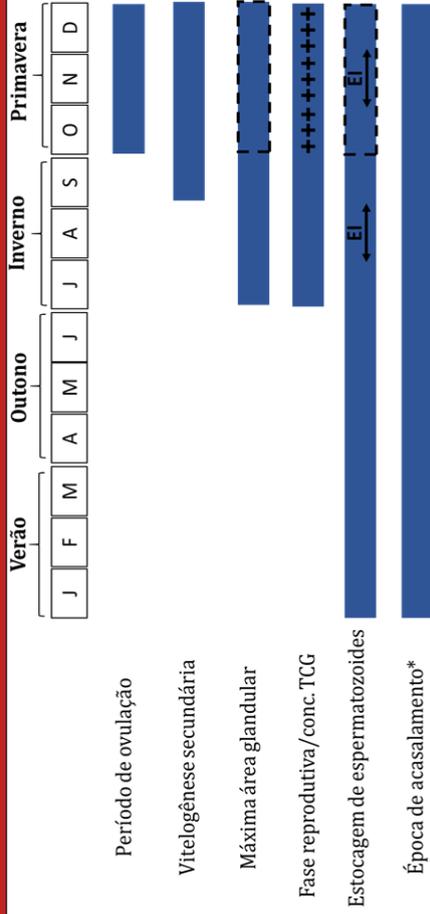
A espécie *Micrurus paraensis* apresentou fêmeas com folículos em vitelogênese secundária, ocorrendo de setembro a novembro (primavera), não identificamos espécimes com ovos no oviduto (Fig. 7). Pela análise histológica, verificamos que na primavera o epitélio apresentava-se em atividade secretiva, exibia a conformação colunar ciliada, alta concentração de TCGs na lâmina própria e poucos pontos de secreção no lúmen infundibular (Fig. 9A). O útero glandular exibia a conformação colunar ciliada com a presença de células secretoras compondo o epitélio, no tecido conjuntivo verificamos a presença de glândulas em estado de hipertrofia (Fig. 9B). O útero posterior apresentava o epitélio colunar ciliado e diversos TCGs com grânulos fragmentados no lúmen (Fig. 9C).

No verão verificamos fêmeas exibindo o epitélio cúbico sem cílios na maior parte da porção infundibular, apresentado células ciliadas apenas nos locais próximos aos TCGs. E observamos pouca secreção no lúmen do infundíbulo. No útero glandular a condição epitelial era cúbica sem cílios e as glândulas estavam hipotrofiadas. O útero aglandular apresentava alguns pontos de secreção no lúmen, alta concentração de TCGs na lâmina própria e o epitélio colunar ciliado.

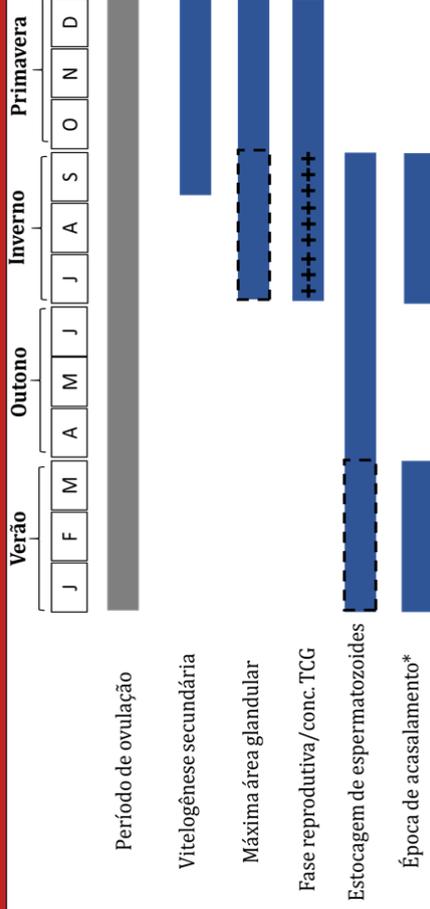
No outono o epitélio ovidutal estava com conformação cúbica ciliada e verificamos pouca secreção no lúmen. No útero glandular verificamos uma baixa concentração de glândula e algumas estavam em estado de hipotrofia e outras em hipertrofia. No útero aglandular exibia o epitélio cúbico ciliado, diversos pontos com secreção luminal. No inverno os espécimes apresentavam o infundíbulo posterior com o epitélio colunar ciliado, grande

concentração de TCGs (Fig. 9D), células secretoras em algumas porções do epitélio e alguns pontos com secreção no lúmen infundibular. No útero glandular, verificamos maior concentração de glândulas exócrinas, em relação a estação do outono, porém essas ainda apresentavam os estados de hipotrofia e outras em hipertrofia; e o epitélio exibia a conformação cúbico ciliado (Fig. 9E). Na porção do útero aglandular, constatamos o epitélio colunar ciliado e pouca secreção no lúmen (Fig. 9F). Para a análise da área glandular entre as estações em *M. paraensis* não obtivemos diferença significativa (Fig. 7).

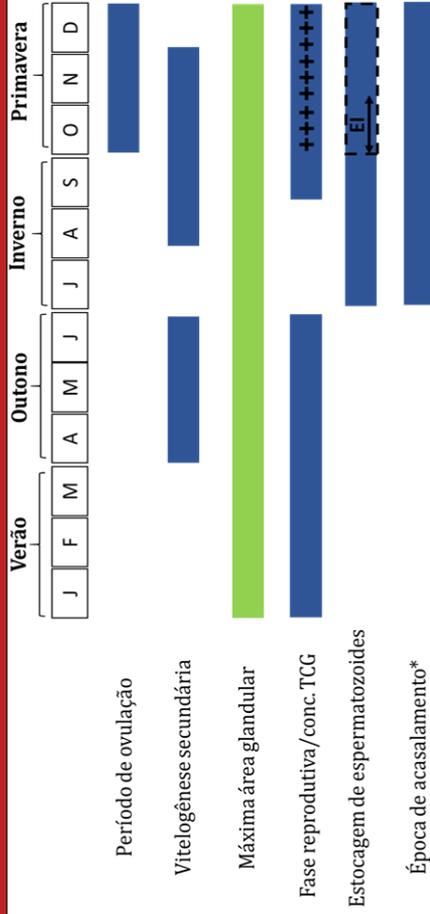
### *Micrurus altirostris*



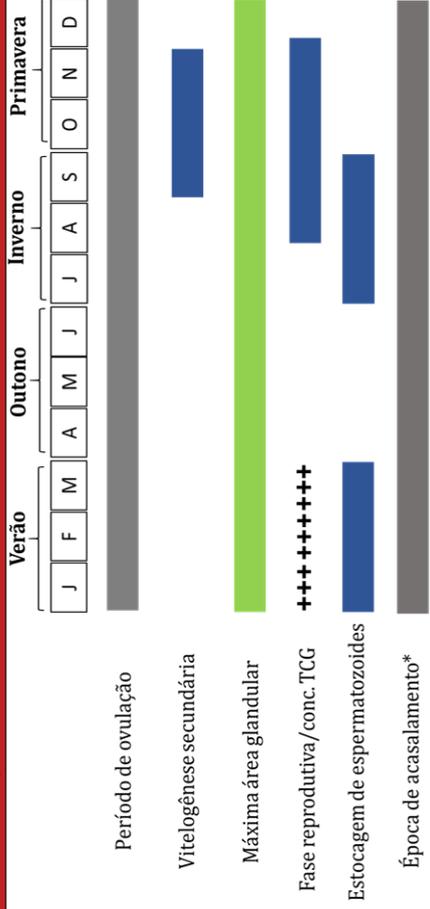
### *Micrurus ibiboboca*



### *Micrurus surinamensis*



### *Micrurus paraensis*



Resumo dos ciclos reprodutivos das espécies de coral verdadeira. **Cruz preta:** período de maior concentração de glândulas tubulares ciliadas armazenando grânulos, na região do útero aglandular; **faixa azul:** resultado indicando período de ocorrência; **faixa cinza:** não obtivemos dados conclusivo entre as estações; **faixa verde:** resultado não apresentou diferença significativa entre as estações ( $P > 0,05$ ); **retângulo tracejado:** período de maior incidência ou resultado com diferença significativa ( $P < 0,05$ ); **(conc. TCG)** concentração de glândulas tubulares ciliadas; **(EI)** período de ocorrência de estocagem de espermatozoides no infundíbulo posterior. (\*) evidenciado pela presença de espermatozoides no lúmen das regiões útero e vagina.

### 3.2 - Estocagem de espermatozoides e espermatozoides no lúmen

O oviduto apresentava nas porções infundíbulo posterior e útero aglandular, os receptáculos de estocagem (TCG, quando ausente de espermatozoide; SSr com espermatozoides no lúmen), para ambas as regiões constatamos semelhanças na morfologia, porém com diferenças na atividade secretora.

No infundíbulo posterior as estruturas de receptáculos de estocagem, exibiam a conformação de glândulas alveolares ramificadas, que se comunicam com o lúmen por ductos ciliados, sendo observado na lâmina histológica a formação de diversos compartimento em posição mais interiorizada na lâmina própria. O epitélio luminal, próximo aos receptáculos, apresenta-se ciliado e em alguns casos com maior altura dos cílios. Assim, na lâmina histológica encontramos uma sequência de receptáculos lado-a-lado (Fig. 11A, B). O epitélio das estruturas de receptáculo, na porção do ducto da glândula, geralmente é composto de células ciliadas. E em compartimentos mais interiorizados, porção secretora da glândula, as células exibiam maior altura e área de citoplasma (Fig. 11C). Porém, mesmo havendo grande quantidade de secreção no lúmen infundibular (e.g., fase reprodutiva), a presença TCGs e SSr contendo grânulos armazenados foi praticamente ausente.

Nas estruturas localizadas na porção do útero aglandular, a conformação apresentada pelos receptáculos foi de glândula tubular ciliada simples, exibindo menor altura do epitélio, geralmente compondo o epitélio com células ciliadas intercaladas com células não ciliadas (secretoras). Em comum, as estruturas TCG e SSr localizadas no útero aglandular identificamos a presença de grânulos de secreção no lúmen, geralmente com um formato denso e compacto (ocupando quase área luminal) ou com pequenos fragmentos. Entretanto, a presença desses grânulos variou entre as estações, sendo evidenciado prioritariamente nas estruturas de estocagem do útero aglandular (Fig. 11D-F).

A estocagem de espermatozoides ocorreu em todas as espécies de *Micrurus*, na porção do útero aglandular. Em *M. altirostris* (Tabela 4) identificamos a ocorrência de estocagem nas quatro estações do ano; em *M. ibiboboca* (Tabela 5) nas estações verão, outono e inverno; para *M. paraensis* (Tabela 6) verão e inverno; e *M. surinamensis* (Tabela 7) na primavera e inverno.

Na análise histoquímica realizada no infundíbulo posterior, verificamos que para os reagentes CB, PAS e AB, o epitélio dos receptáculos de estocagem (SSr) apresentou reatividade positiva apenas para o corante AB (Fig. 12A-C). Enquanto o epitélio luminal do infundíbulo, exibiu reação positiva para PAS e AB (Fig. 12B, C). No útero aglandular, os SSr exibiram reatividade positiva ao PAS (Fig. 12D, E) e AB (Fig. 12F); os grânulos de secreção armazenados no lúmen dos TCGs e SSr também mostraram reação positiva aos reagentes PAS e AB (Fig. 12E, F).

Na análise macroscópica do oviduto observamos uma diferença anatômica da porção final do útero aglandular, de dois espécimes de *M. altirostris* (espécimes da primavera 808-UFSM / 89617-IB), um de *M. surinamensis* (espécime do outono 32138-INPA), e um de *M. ibiboboca* (espécime do outono 402-INMA). Essa diferença anatômica localizada na porção distal do útero aglandular (ou junção útero-vaginal, JUV), apresentava uma conformação anatômica helicoidal no oviduto (Fig. 13A). Pela análise histológica de uma das dobras, evidenciamos na região luminal um material gelatinoso agregado com diversos espermatozoides agregados, possivelmente uma secreção seminal (Fig. 13B).

### **3.3 - Maturidade sexual**

A espécie *Micrurus altirostris* exibiu a menor fêmea madura com 490 mm de Crc, 26 g de massa corpórea, folículos em vitelogênese primária e com espermatozoides na região distal do útero aglandular. Para a espécie *M. ibiboboca* verificamos a maturidade pela

presença de espermatozoides no lúmen da junção-útero vaginal, o espécime apresentava 541 mm de Crc; 32 g de massa corpórea e folículos em vitelogênese primária. Em *M. surinamensis* constatamos a maturidade sexual no espécime com 776 de Crc; 212,2 g de massa do corpo com folículos em vitelogênese secundária no ovário e presença de espermatozoides no lúmen uterino. Para *M. paraensis* verificamos a menor fêmea madura com 424 mm de Crc; 23,1 g de massa do corpo em vitelogênese primária e com espermatozoides no lúmen do útero aglandular.

Tabela 4. Dados histológicos e macroscópicos das fêmeas que apresentaram estocagem de espermatozoides ou espermatozoides no lúmen ovidutal. (**Crc**) comprimento rostro-cloacal; (**D**) lado direito; (**E**) lado esquerdo; (**INV**) inverno; (**OUT**) outono; (**PRI**) primavera; (**VER**) verão; (**JUV**) junção útero-vaginal; (**UMT**) torção muscular uterina; (**V1**) folículos em vitelogênese primária; (**V2**) folículo em vitelogênese.

Espécime	Espermatozoides no lúmen da JUV	Estocagem		Data/Estação	Crc (mm)	Condição do ovário	Comprimento do maior folículo/ ovo, D e E (mm)
		(Infundíbulo Posterior)	(Útero aglandular)				
<i>Micrurus altirostris</i>	sim		X	22/06 - OUT	710	V1	3,51 - 3,61
<i>Micrurus altirostris</i>	não		X	28/02 - VER	632	V1	3,61 - 3,57
<i>Micrurus altirostris</i>	sim		X	07/08 - INV	572	V1	2,02 - 2,26
<i>Micrurus altirostris</i>	sim		X	13/09 - INV	523	V2	9,05 - 11,94
<i>Micrurus altirostris</i>	sim	X	X	21/08 - INV	490	V1	2,18 - 4,17
<i>Micrurus altirostris</i>	sim		X	26/10 - PRI	616	V1	8,39 - 8,11
<i>Micrurus altirostris</i>	não		X	26/11 - PRI	608	V1	7,48 - 6,08
<i>Micrurus altirostris</i>	sim		X	25/05 - OUT	533	V1	5,31 - 6,5
<i>Micrurus altirostris</i>	não		X	03/02 - VER	523	V1	2,46 - 2,27
<i>Micrurus altirostris</i>	sim UMT		X	01/10 - INV	645	V2	19,9 - 22
<i>Micrurus altirostris</i>	sim		X	15/11 - PRI	503	V2	14,0 - 4,0
<i>Micrurus altirostris</i>	sim	X	X	21/11 - PRI	681	Ovo	29,0 - 36,9
<i>Micrurus altirostris</i>	não		X	19/11 - PRI	590	Ovo	35,2 - 36,24

Tabela 5. Dados histológicos e macroscópicos das fêmeas que apresentaram estocagem de espermatozoides ou espermatozoides no lúmen ovidutal. (**Crc**) comprimento rostro-cloacal; (**D**) lado direito; (**E**) lado esquerdo; (**INV**) inverno; (**OUT**) outono; (**PRI**) primavera; (**VER**) verão; (**JUV**) junção útero-vaginal; (**V1**) folículos em vitelogênese primária; (**V2**) folículo em vitelogênese. (\*) medida do comprimento não registrado.

Espécime	Espermatozoides no lúmen da JUV	Estocagem		Data/Estação	Crc (mm)	Condição do ovário	Comprimento do maior folículo/ ovo, D e E (mm)
		(Infundíbulo Posterior)	(Útero aglandular)				
<i>Micrurus ibiboboca</i>	não		x	01/07 - INV	770	V1	3,06 - 2,61
<i>Micrurus ibiboboca</i>	não		x	3/04 - OUT	610	V1	4,4 - 4,4
<i>Micrurus ibiboboca</i>	sim		x	08/03 - VER	760	V1	2,02 - *
<i>Micrurus ibiboboca</i>	sim		x	19/09 - INV	635	V1	4,03 - *
<i>Micrurus ibiboboca</i>	não		x	22/01 - VER	541	V1	1,33 - *
<i>Micrurus ibiboboca</i>	sim		x	20/09 - INV	543	V1	4,73 - *
<i>Micrurus ibiboboca</i>	não		x	04/01 VER	930	V1	1,58 - *

<i>Micrurus ibiboboca</i>	sim		08/07 - INV	740	V1	3,65 - *
<i>Micrurus ibiboboca</i>	sim		02/01 - VER	692	V1	3,85 - *
<i>Micrurus ibiboboca</i>	não	x	29/02 - VER	584	V1	1,16 - *

Tabela 6. Dados histológicos e macroscópicos das fêmeas que apresentaram estocagem de espermatozoides ou espermatóides no lúmen ovidutal. (**Crc**) comprimento rostro-cloacal; (**D**) lado direito; (**E**) lado esquerdo; (**INV**) inverno; (**OUT**) outono; (**PRI**) primavera; (**VER**) verão; (**JUV**) junção útero-vaginal; (**V1**) folículos em vitelogênese primária; (**V2**) folículo em vitelogênese.

Espécime	Espermatozoides no lúmen da JUV	Estocagem		Data/Estação	Crc (mm)	Condição do ovário	Comprimento do maior folículo/ovo, D e E (mm)
		(Infundíbulo Posterior)	(Útero aglandular)				
<i>Micrurus paraensis</i>	não		X	1/09 - INV	429	V1	2,78 - 2,43
<i>Micrurus paraensis</i>	não		X	18/02 - VER	462	V1	2,74 - 2,72

Tabela 7. Dados histológicos e macroscópicos das fêmeas que apresentaram estocagem de espermatozoides ou espermatóides no lúmen ovidutal. (**Crc**) comprimento rostro-cloacal; (**D**) lado direito; (**E**) lado esquerdo; (**INV**) inverno; (**JUV**) junção útero-vaginal; (**OUT**) outono; (**PRI**) primavera; (**VER**) verão; (**V1**) folículos em vitelogênese primária; (**V2**) folículo em vitelogênese.

Espécime	Espermatozoides no lúmen da JUV	Estocagem		Data/estação	Crc (mm)	Condição do ovário	Comprimento do maior folículo/ovo, D e E (mm)
		(Infundíbulo Posterior)	(Útero aglandular)				
<i>Micrurus surinamensis</i>	sim		X	22/08 - INV	776	V2	11,57 - 9,53
<i>Micrurus surinamensis</i>	não		X	16/09 - INV	842	V2	5,18 - 6,05
<i>Micrurus surinamensis</i>	não		X	20/10 - PRI	970	V2	25,91 - 21,04
<i>Micrurus surinamensis</i>	sim	X	X	29/10 - PRI	1045	V2	41,68 - 42,23 (ovos)
<i>Micrurus surinamensis</i>	não		X	14/10 - PRI	832	V1	5,74 - 5,18
<i>Micrurus surinamensis</i>	sim		X	14/10 - PRI	910	V1	21,71 - 21,51

### 3.4 -Histoquímica

O resultado das reações histoquímicas nas glândulas exócrinas presentes no útero glandular, foram similares para todas as espécies. Na análise das glândulas exócrina do útero aglandular, verificamos que para os reativos PAS e AB, glândulas hipertrofiadas não apresentaram reação positiva (Fig. 14A, B). Entretanto, na reação com o azul brilhante de Coomassie (CB), as glândulas reagiram positivamente para a presença de proteínas (Fig. 14C, D). Os espécimes que exibiam glândulas exócrinas em estado de hipotrofia, a reatividade ao CB foi fraca ou inexistente.

Na comparação das diferentes porções do oviduto, os corantes reagiram com maior intensidade na conformação do epitélio colunar ciliado. Nos períodos de baixa atividade do oviduto

(fase não reprodutiva da espécie), a reação era fraca ou ausente. Na análise do epitélio ovidutal houve reação positiva aos corantes PAS e AB, sendo um resultado em comum para todas as espécies a reatividade na primavera. Para o epitélio da vagina, evidenciamos a presença de células caliciformes e, na análise histoquímica, houve reação positiva apenas para o PAS e AB (Fig. 14E, F).

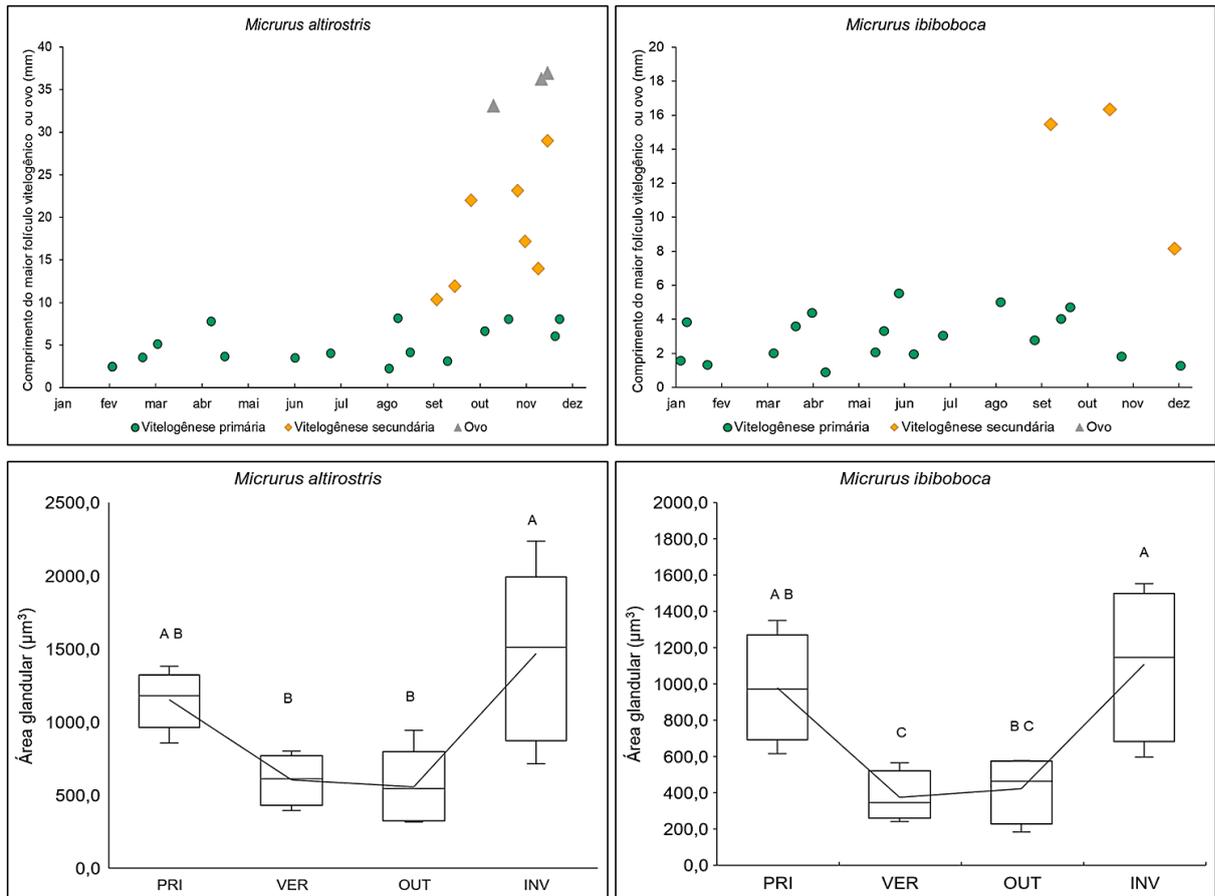


Figura 2. Prancha com os gráficos de dispersão dos folículos vitelogênicos (meses do ano) e gráficos boxplot referente à média de área das glândulas exócrinas (útero glandular), entre as estações do ano. Espécies *Micrurus altirostris* e *Micrurus ibiboboca*. Letras diferentes entre os diagramas de caixas (estações), indicam variação significativa entre as médias ( $P < 0,05$ ). Reta interligando os diagramas de caixas, indica a média de cada grupo. (INV) inverno; (OUT) outono; (PRI) primavera; (VER) verão.

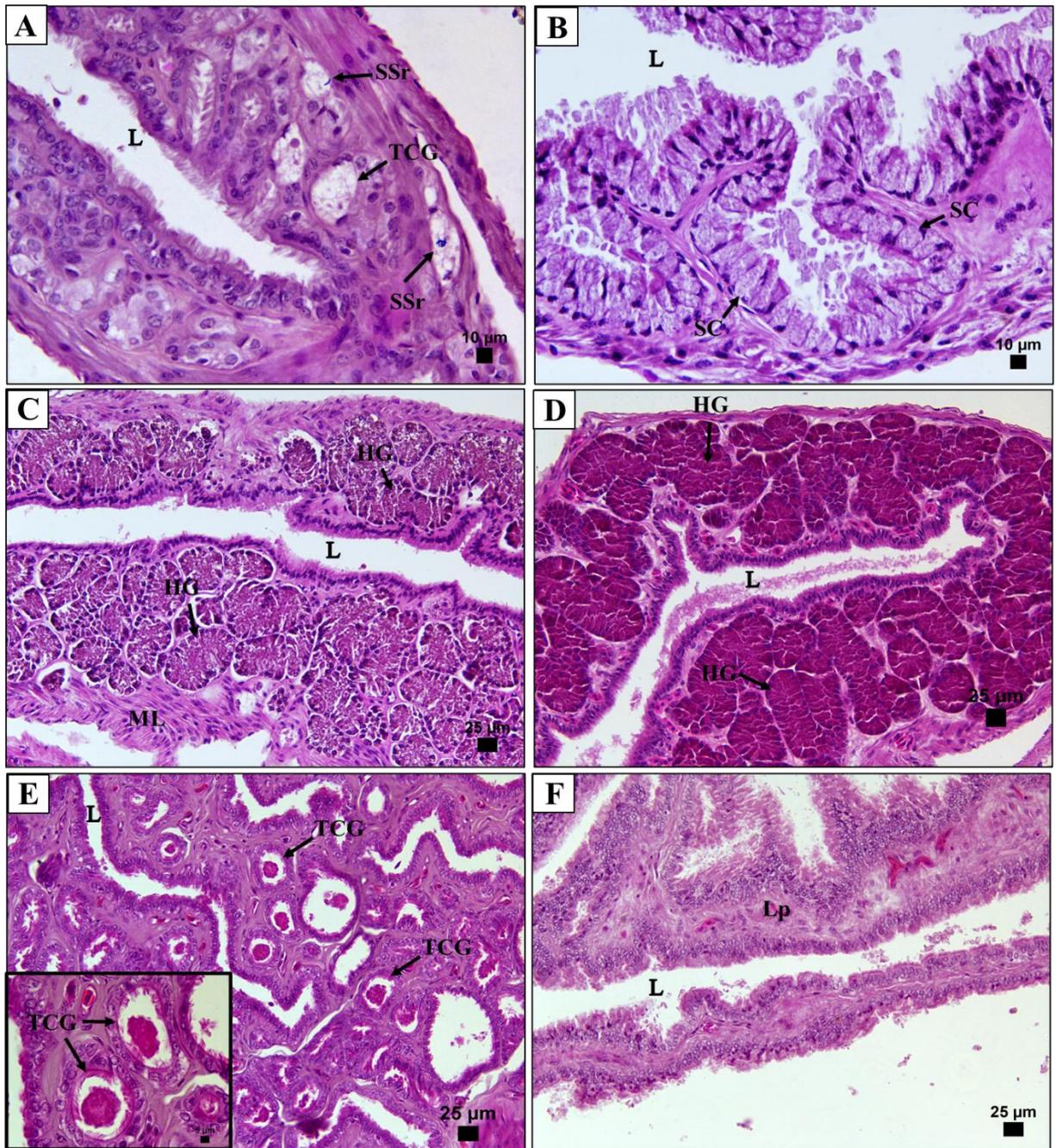


Figura 3. Fotomicrografia do oviduto de *Micrurus altirostris*, cortes longitudinais de espécimes coletados na primavera. (H/E). (A) infundíbulo posterior exibindo o epitélio colunar ciliado e a presença de TCG e SSr na lâmina própria. (B) infundíbulo posterior exibindo epitélio colunar ciliado e células secretoras (núcleo em posição basal). (C-D) útero glandular apresentando as glândulas exócrinas em estado de hipertrofia, epitélio colunar ciliado, e secreção no lúmen. (E) útero aglandular apresentando grande quantidade de TCGs com grânulos de secreção no lúmen. (F) útero aglandular exibindo epitélio pseudoestratificado. (HG) glândula hipertrofiada; (G) glândula hipotrofiada; (L) lúmen; (Lp) lâmina própria; (TCG) glândula tubular ciliada; (SC) célula secretora; (SSr) receptáculo de estocagem de espermatozoide.

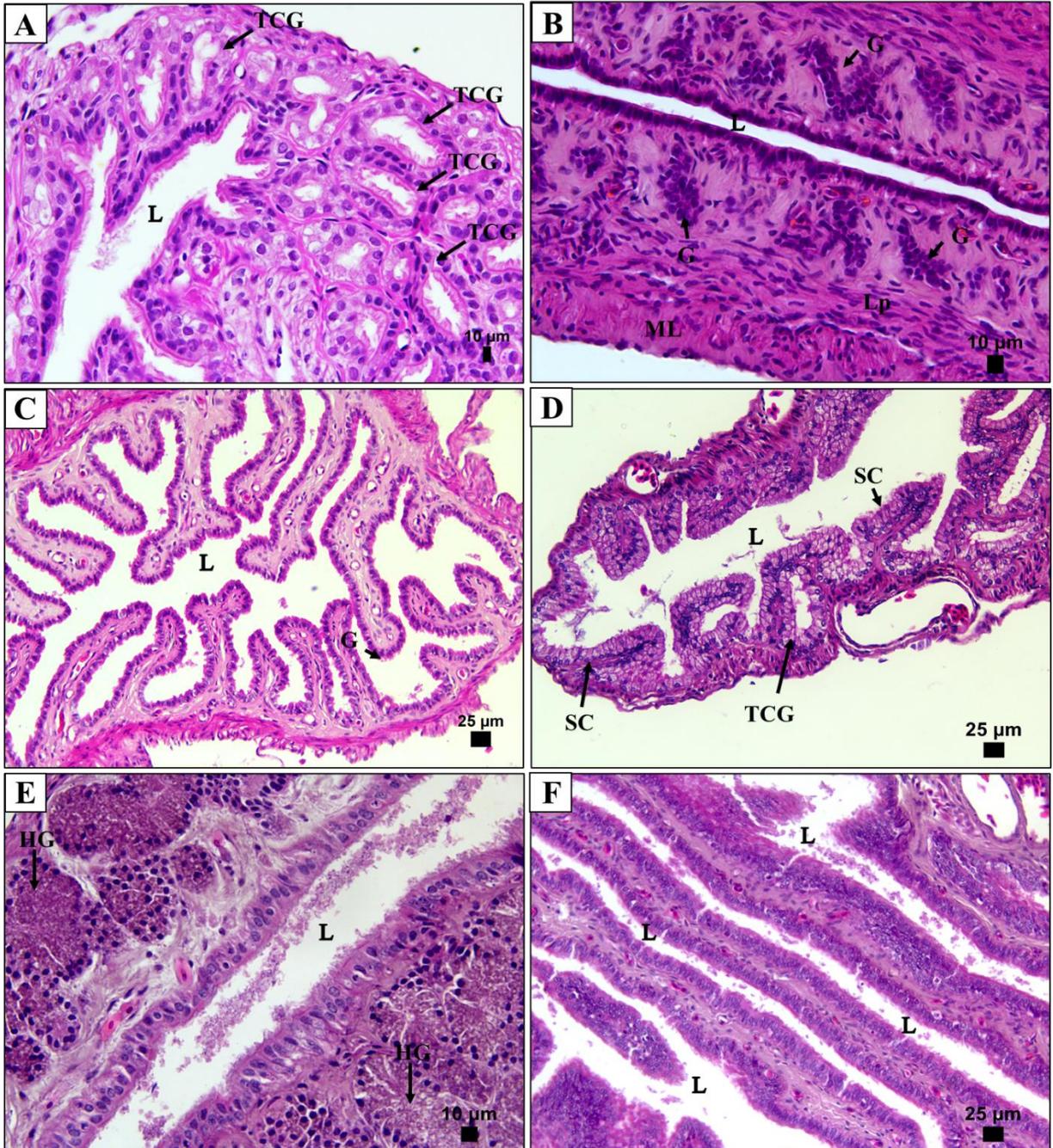


Figura 4. Fotomicrografia do oviduto de *Micrurus altirostris*, cortes longitudinais. (H/E). (A) infundíbulo posterior exibindo epitélio cúbico ciliado, e a presença de diversos TCGs na lâmina própria; espécime do verão. (B) útero glandular apresentando o epitélio cúbico sem cílios, glândulas exócrinas hipotrofiadas; espécime do verão. (C) útero aglandular exibindo epitélio cúbico ciliado e ausência de secreção no lúmen, espécime do verão. (D) infundíbulo posterior apresentando epitélio colunar ciliado e células secretoras; espécime do inverno. (E) útero glandular apresentando o epitélio colunar ciliado, glândulas exócrinas hipertrofiadas e diversos pontos com secreção no lúmen; espécime do inverno. (F) útero aglandular apresentando epitélio colunar ciliado; espécime do inverno. (HG) glândula hipertrofiada; (G) glândula hipotrofiada; (L) lúmen; (Lp) lâmina própria; (ML) camada muscular; (TCG) glândula tubular ciliada; (SC) célula secretora; (SSr) receptáculo de estocagem de espermatozoide.

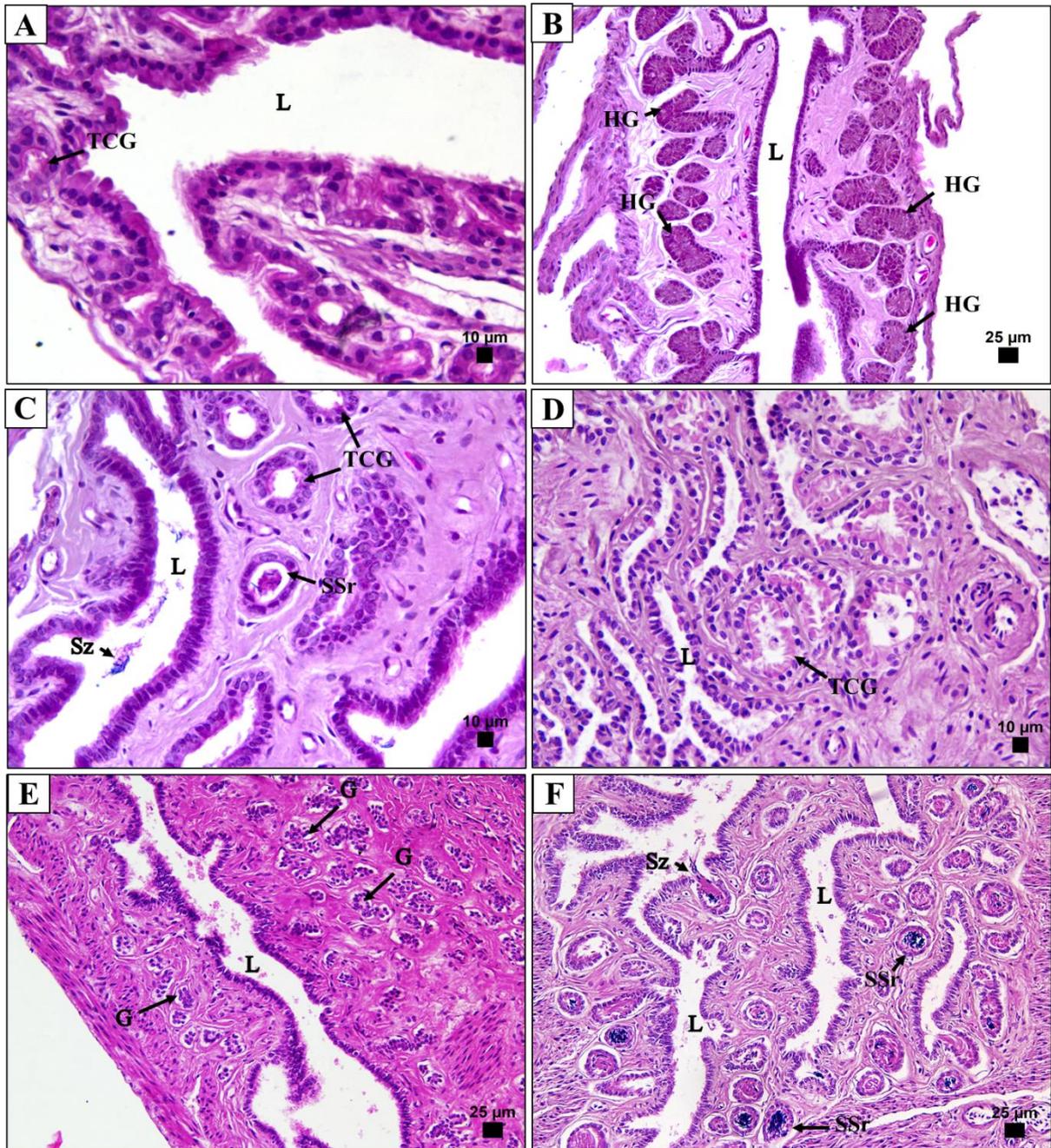


Figura 5. Fotomicrografia do oviduto de *Micrurus ibiboboca*, cortes longitudinais. (H/E). (A) infundíbulo posterior exibindo epitélio colunar ciliado; espécime da primavera. (B) útero glandular apresentando o epitélio colunar sem cílios e glândulas exócrinas hipertrofiadas; espécime da primavera. (C) útero aglandular apresentando o epitélio colunar ciliado, presença de TCGs e em alguns espécimes SSr na lâmia própria, espécime da primavera. (D) infundíbulo posterior exibindo epitélio cúbico sem cílios e a presença de TCG; espécime do verão. (E) útero glandular apresentando o epitélio cúbico ciliado, glândulas exócrinas hipotrofiadas; espécime do verão. (F) útero aglandular exibindo epitélio colunar ciliado, e diversos SSr na lâmina própria; espécime do verão. (HG) glândula hipertrofiada; (G) glândula hipotrofiada; (L) lúmen; (TCG) glândula tubular ciliada; (SSr) receptáculo de estocagem de espermatozoide; (SZ) espermatozoides.

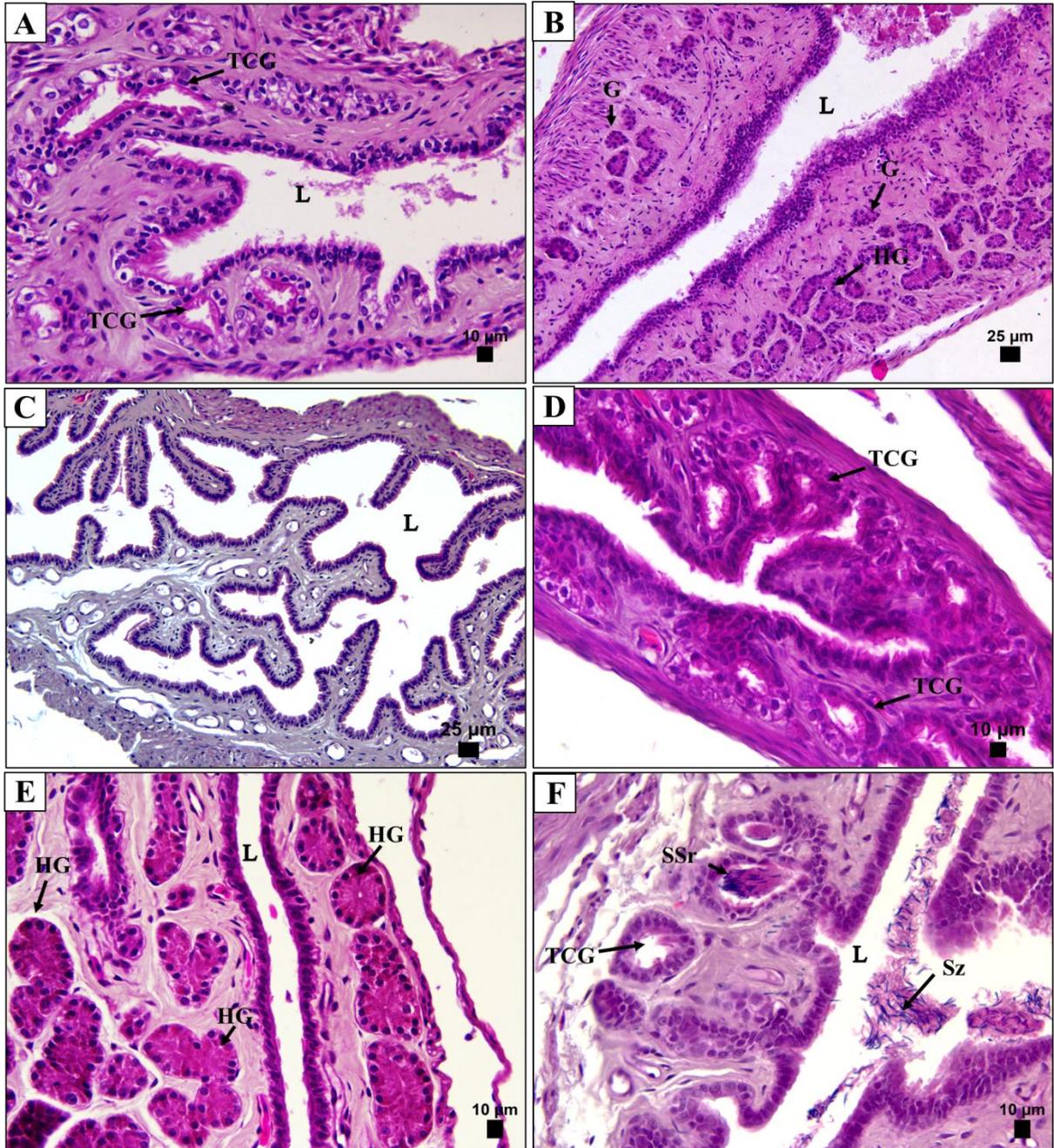


Figura 6. Fotomicrografia do oviduto de *Micrurus ibiboboca*, cortes longitudinais. (H/E). (A) infundíbulo posterior exibindo epitélio colunar ciliado; espécime do outono. (B) útero glandular apresentando o epitélio cúbico sem cílios, glândulas exócrinas hipertrofiadas e outras em estado de hipotrofia; espécime do outono. (C) útero aglandular exibindo epitélio colunar ciliado e ausente de secreção no lúmen, espécime do outono. (D) infundíbulo posterior exibindo epitélio colunar ciliado e alguns TCGs na lâmina própria; espécime do inverno. (E) útero glandular apresentando o epitélio colunar sem cílios, glândulas exócrinas hipertrofiadas; espécime do inverno (F) útero aglandular apresentando o epitélio colunar ciliado, espermatozoides estocados em SSr e no lúmen uterino; espécime do inverno. (HG) glândula hipertrofiada; (G) glândula hipotrofiada; (L) lúmen; (TCG) glândula tubular ciliada; (SSr) receptáculo de estocagem de espermatozoide; (SZ) espermatozoides.

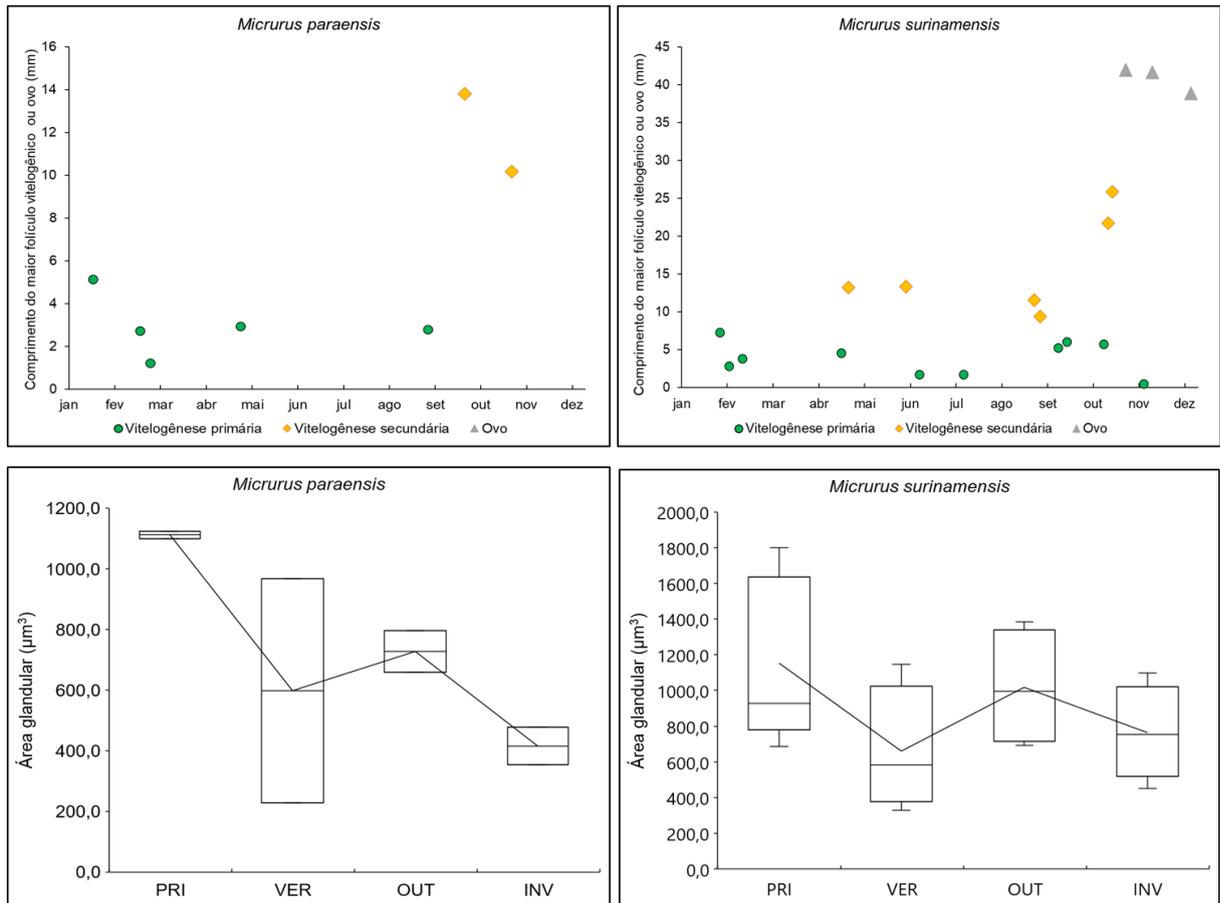


Figura 7. Prancha com os gráficos de dispersão dos folículos vitelogênicos (meses do ano) e gráficos boxplot referente à média de área das glândulas exócrinas (útero glandular), entre as estações do ano. Espécies *Micrurus paraensis* e *Micrurus surinamensis*. Letras diferentes entre os diagramas de caixas (estações), significativa variação significativa entre as médias ( $P < 0,05$ ), quando ausente, não houve diferença. Reta interligando os diagramas de caixas, indica a média de cada grupo. (INV) inverno; (OUT) outono; (PRI) primavera; (VER) verão.

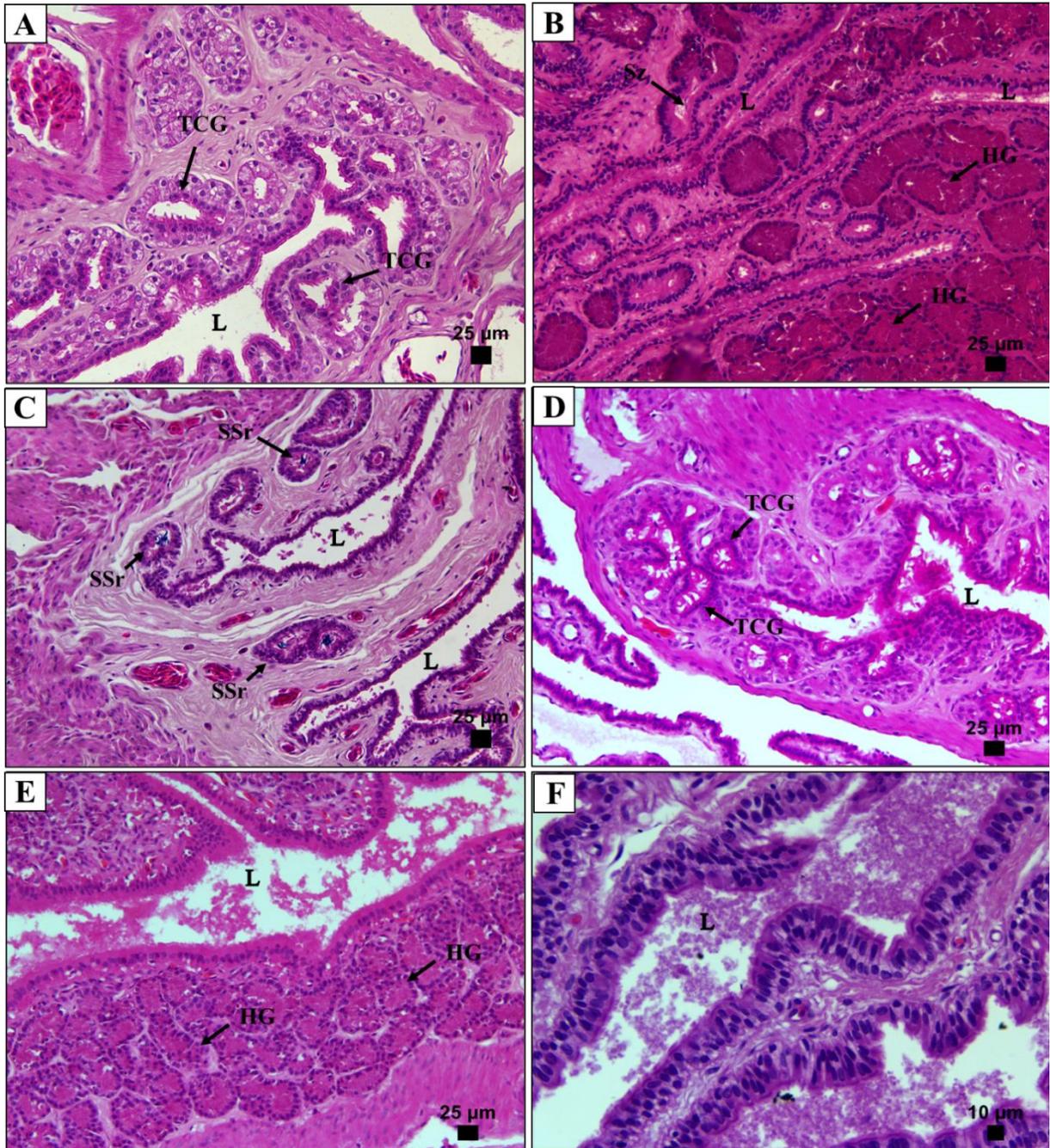


Figura 8. Fotomicrografia do oviduto de *Micrurus surinamensis*, cortes longitudinais. (H/E). (A) infundíbulo posterior exibindo epitélio colunar ciliado e a presença de TCG na lâmina própria; espécime da primavera. (B) útero glandular apresentando o epitélio colunar ciliado, grande concentração de glândulas exócrinas hipertrofiadas e alguns espécimes exibindo o lúmen com secreção em quase sua totalidade; espécime da primavera. (C) útero aglandular exibindo epitélio colunar ciliado, alguns pontos com secreção no lúmen e a presença de SSr no tecido conjuntivo; espécime da primavera. (D) infundíbulo posterior exibindo epitélio colunar ciliado e diversos TCG na lâmina própria; espécime do verão. (E) útero glandular apresentando o epitélio colunar ciliado, glândulas exócrinas hipertrofiadas; e diversos pontos com secreção no lúmen; espécime do verão. (F) útero aglandular apresentando o epitélio colunar ciliado e área luminal com secreção em quase sua totalidade; espécime do verão. (HG) glândula hipertrofiada; (L) lúmen; (SSr) receptáculo de estocagem de espermatozoide.

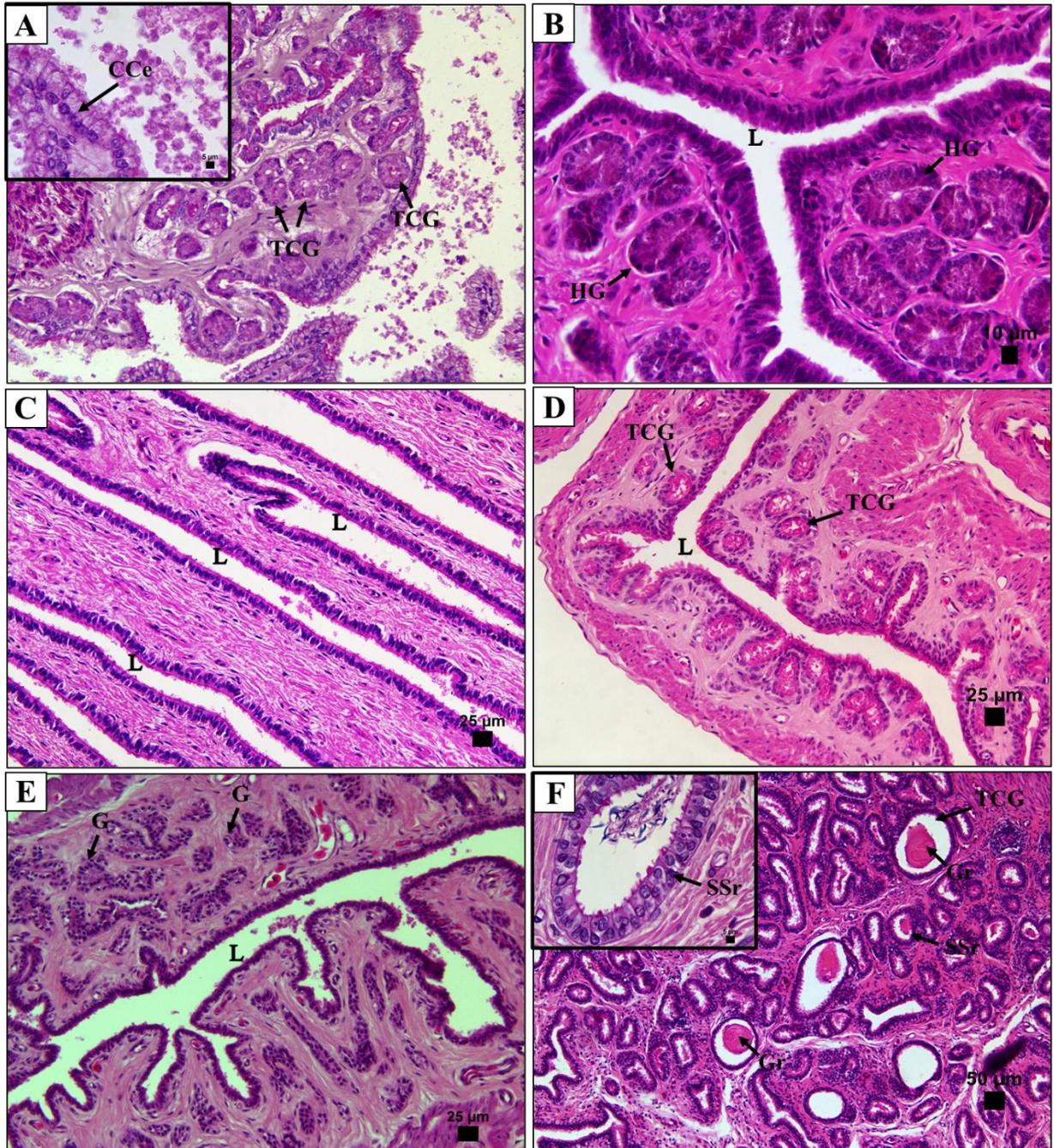


Figura 9. Fotomicrografia do oviduto de *Micrurus surinamensis*, cortes longitudinais. (H/E). (A) infundíbulo posterior exibindo epitélio colunar ciliado; presença de TCGs na lâmina própria e diversos pontos com secreção no lúmen; espécime do outono. (B) útero glandular apresentando o epitélio colunar ciliado, glândulas exócrinas hipertrofiadas; espécime do outono. (C) útero aglandular exibindo epitélio colunar ciliado, poucos pontos com secreção no lúmen, espécime do outono. (D) infundíbulo posterior exibindo epitélio colunar ciliado, presença de TCGs na lâmina própria; espécime do inverno. (E) útero glandular apresentando o epitélio cúbico ciliado, glândulas exócrinas hipotrofiadas; espécime inverno. (F) útero aglandular apresentando o epitélio colunar ciliado, grande quantidade de TCGs exibindo grânulos, densos e compactos internalizados no lúmen; em detalhe, a presença de SSr; espécime do inverno. (CCe) epitélio colunar ciliado; (G) glândula hipotrofiada; (Gr) grânulo; (HG) glândula hipertrofiada; (L) lúmen; (SSr) receptáculo de estocagem de espermatozoide; (TCG) glândula tubular ciliada.

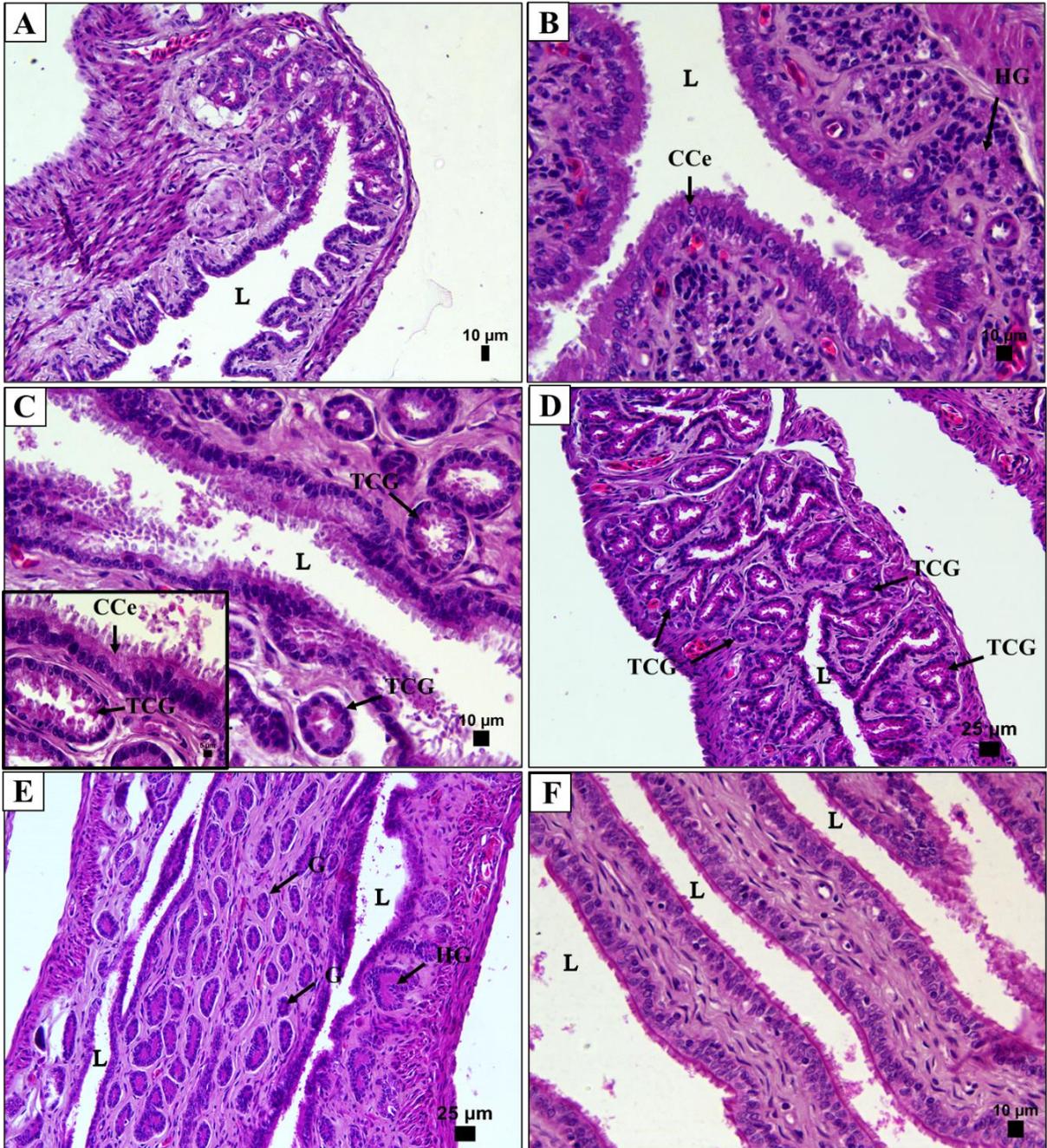


Figura 10. Fotomicrografia do oviduto de *Micrurus paraensis*, cortes longitudinais. (H/E). (A) infundíbulo posterior exibindo epitélio colunar ciliado; espécime da primavera. (B) útero glandular apresentando o epitélio colunar ciliado, glândulas exócrinas hipertrofiadas; espécime da primavera. (C) útero aglandular exibindo epitélio colunar ciliado; em detalhe a presença de TCGs com grânulos fragmentados, diversos pontos com secreção no lúmen, espécime da primavera. (D) infundíbulo posterior exibindo epitélio colunar ciliado e a presença de grande concentração de TCGs na lâmina própria; espécime do inverno. (E) útero glandular apresentando o epitélio cúbico ciliado, glândulas exócrinas hipotrofiadas e outras hipertrofiadas; espécime do inverno. (F) útero aglandular apresentando o epitélio colunar ciliado; espécime do inverno. (CCe) epitélio colunar ciliado; (G) glândula hipotrofiada; (Gr) grânulo; (HG) glândula hipertrofiada; (L) lúmen; (TCG) glândula tubular ciliada.

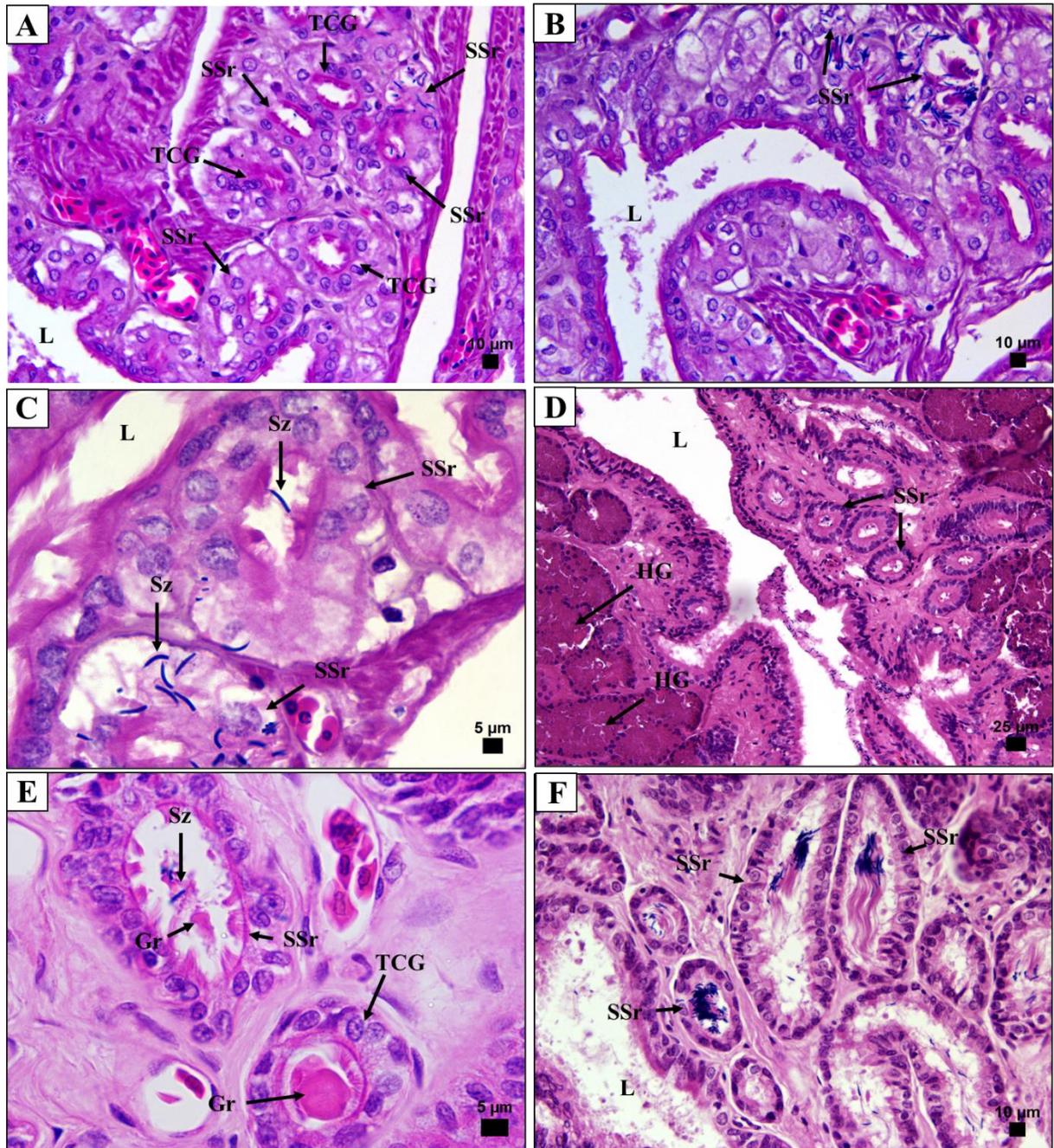


Figura 11. Fotomicrografia do oviduto de espécimes *Micrurus*, cortes longitudinais exibindo receptáculos de estocagem. (A-B) infundíbulo posterior de *Micrurus altirostris* exibindo SSrs e TCGs presentes no tecido conjuntivo. (C) infundíbulo posterior de *Micrurus surinamensis* apresentando espermatozoides no lúmen do SSr. (D) região de transição útero glandular-aglandular de *Micrurus surinamensis*, apresentando SSr próximo de glândulas exócrinas hipertrofiadas. (E) útero aglandular de *Micrurus paraensis* exibindo SSr com grânulos fragmentados e TCG com um grânulo denso e compacto internalizado. (F) útero aglandular de *Micrurus ibiboboca*, exibindo espermatozoides estocados em receptáculos de estocagem. (Gr) grânulo; (HG) glândula hipertrofiada; (L) lúmen; (SSr) receptáculo de estocagem de espermatozoide; (Sz) espermatozoide; (TCG) glândula tubular ciliada.

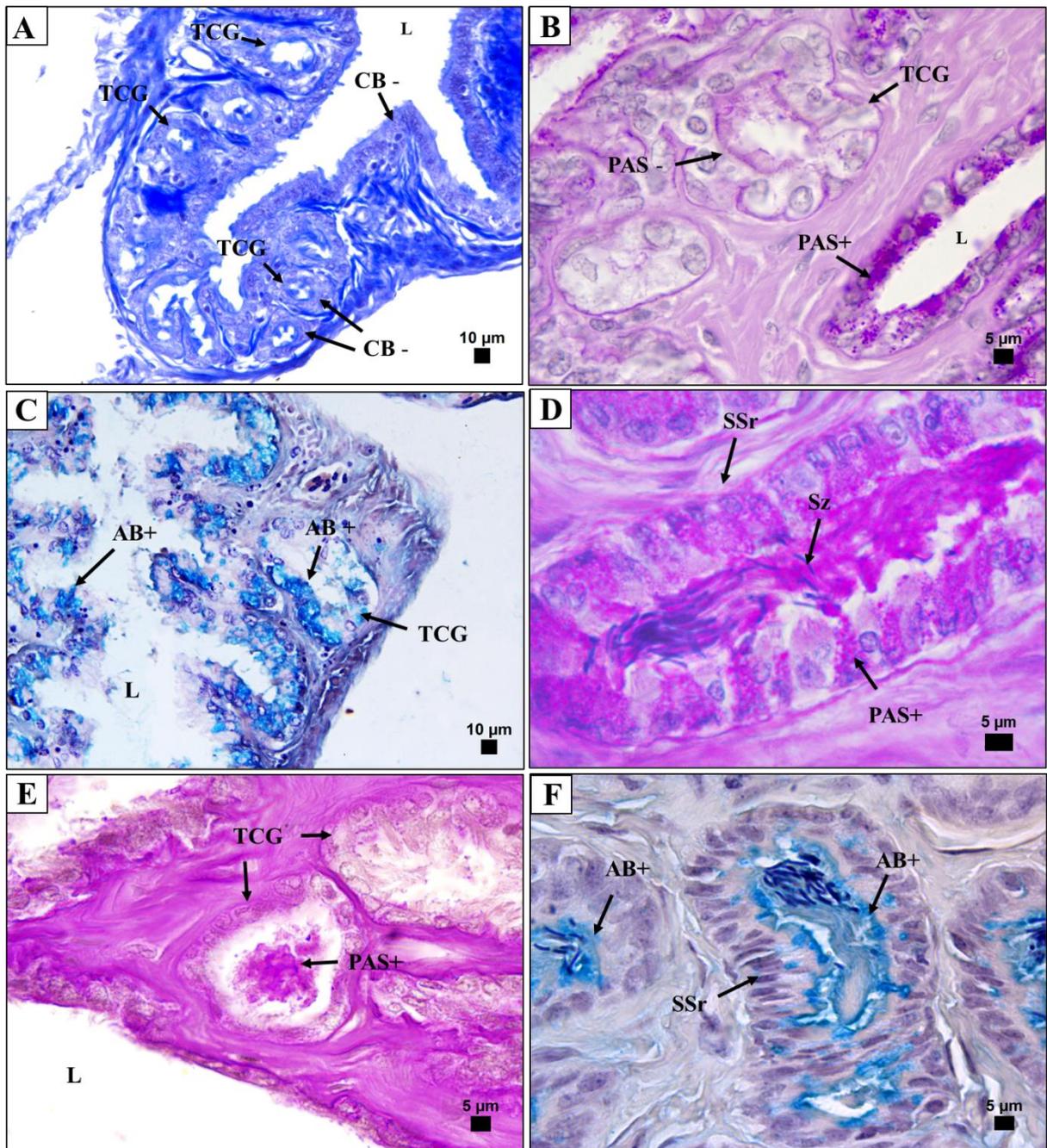


Figura 12. Fotomicrografia do oviduto de espécimes *Micrurus*, cortes longitudinais referentes à histoquímica do epitélio e dos receptáculos de estocagem. (A) infundíbulo posterior exibindo o epitélio e diversos TCG não reagindo ao corante CB. (B) infundíbulo posterior apresentando reação negativa do TCG e positiva do epitélio, ao corante PAS. (C) infundíbulo posterior exibindo reação positiva do epitélio e TCG ao reagente AB. (D-E) útero aglandular apresentando SSr e TCG com grânulos reagindo positivamente ao PAS. (F) útero aglandular apresentando o SSr reagindo positivamente ao AB. (AB) azul de alcian; (CB) azul brilhante de Coomassie; (L) lúmen; (PAS) ácido periódico-Schiff; (SSr) receptáculo de estocagem de espermatozoide; (TCG) glândula tubular ciliada.

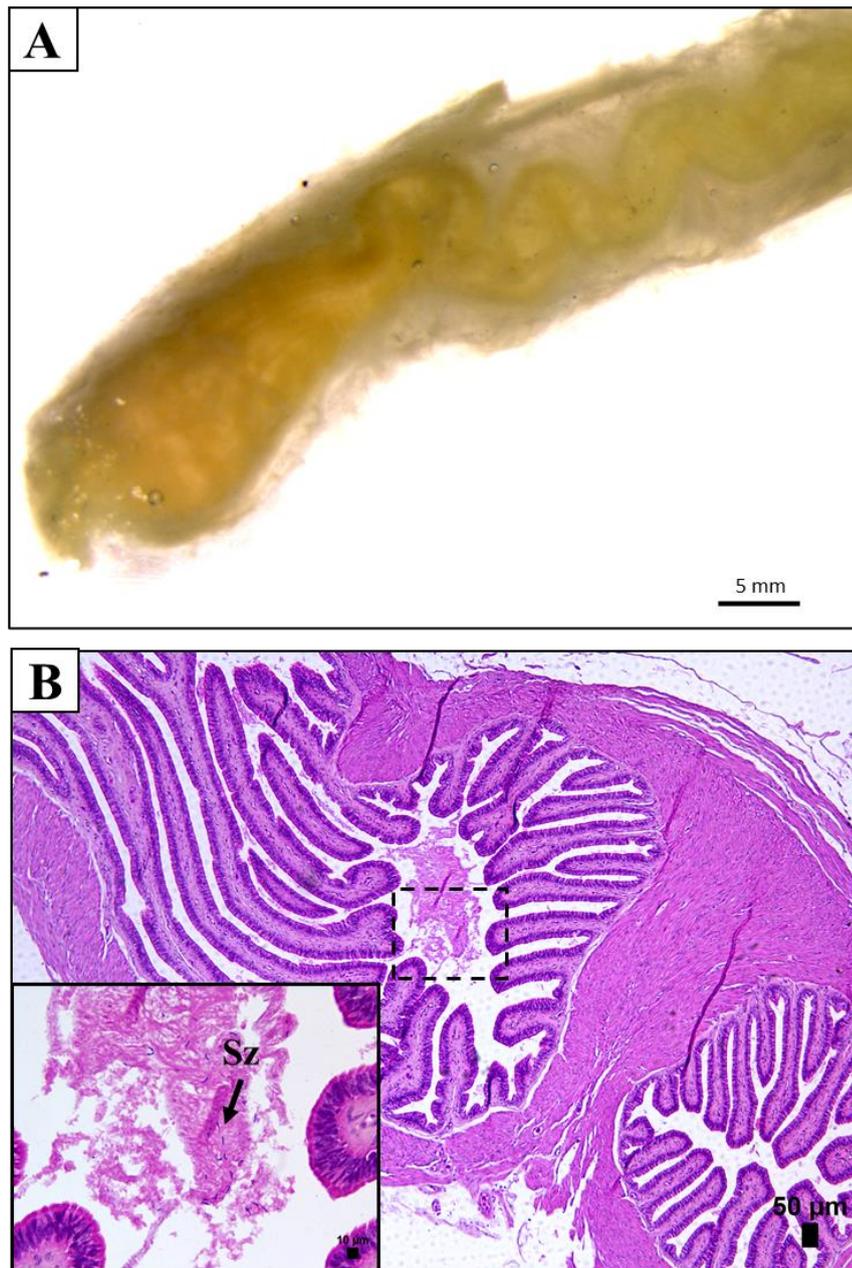


Figura 13. Foto macroscópica e fotomicrografia da junção útero-vaginal. (A) modificação anatômica da porção distal do útero aglandular, assemelhando-se a conformação helicoidal (torção muscular uterina, “UMT”). (B) porção distal do útero aglandular (dobra) de *Micrurus altirostris*, em evidência região destacada em retângulo tracejado (aumento de 40x), observamos a presença de uma massa espermática no lúmen (matriz carreadora). (H/E). (Sz) espermatozoide.

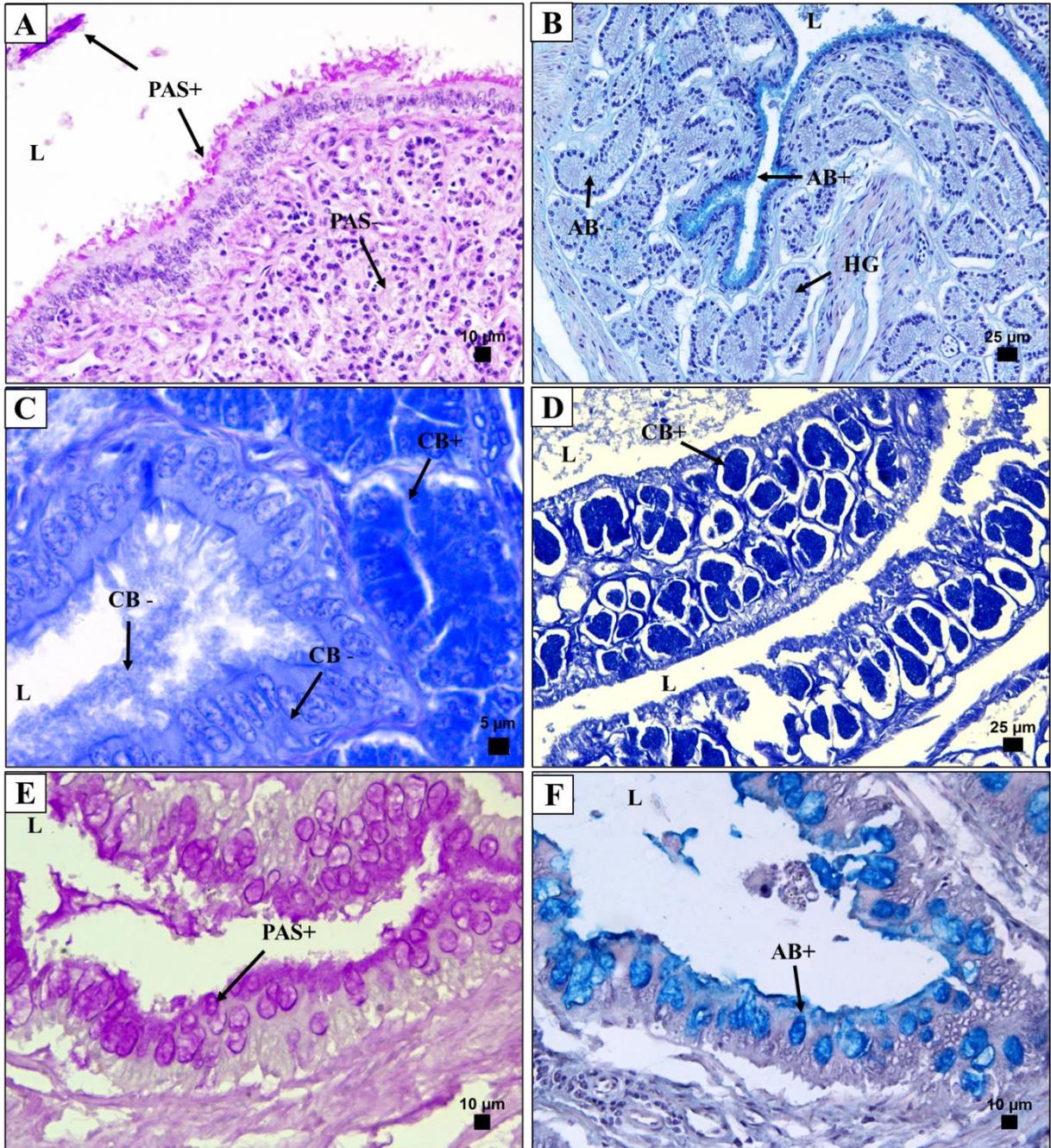


Figura 14. Fotomicrografia do oviduto de espécimes *Micrurus*, cortes longitudinais referentes à histoquímica do útero glandular e porção distal do útero aglandular. Útero glandular exibindo reação negativa das glândulas exócrinas e positiva do epitélio ao corante PAS. (B) útero glandular exibindo reação negativa das glândulas exócrinas e positiva do epitélio ao corante AB. (C-D) útero glandular exibindo epitélio secretivo não reagindo ao corante CB, enquanto as glândulas exócrinas reagiram positivamente ao corante CB. (E) porção distal do útero aglandular (junção útero-vaginal) evidenciando células caliciformes reagindo positivamente ao PAS e AB. (F) porção distal do útero aglandular (junção útero-vaginal) evidenciando células caliciformes reagindo positivamente ao AB. (AB) azul de alcian; (CB) azul brilhante de Coomassie; (GH) glândula hipertrofiada; (L) lúmen; (PAS) ácido periódico-Schiff.

## 4- DISCUSSÃO

### 4.1- Ciclos reprodutivos

As cobras corais apresentaram alguns padrões de estratégias reprodutivas similares entre as espécies de cada linhagem. Marques et al. (2013) propuseram a hipótese das fêmeas do grupo de tríades possuírem o ciclo reprodutivo extenso, sendo está uma característica para o grupo. Entretanto, com os resultados obtidos no presente trabalho, constatamos diferenças desde padrão de ciclo dentro do grupo BRT. *Micrurus altirostris* apresentou de setembro a dezembro, fêmeas com ovos no oviduto, e outros espécimes com folículos em vitelogênese secundária (V2) no ovário. Pelos caracteres reprodutivos do oviduto, verificamos que nessa época, final do inverno e ao longo da primavera, o epitélio exibia a conformação colunar ciliada, as glândulas exócrinas em estado de hipertrofia e diversos pontos com secreção no lúmen, indicando a fase reprodutiva. No verão houve uma regressão dos caracteres reprodutivos, indicado pela conformação do epitélio cúbico sem cílios, estado de hipotrofia glandular, regressão de células secretoras no epitélio e pouca secreção luminal; caracterizando assim a fase não reprodutiva nessa estação. No outono a maioria das fêmeas ainda exibiam baixa atividade ovidutal, apenas alguns apresentavam sinais de retomada da atividade. No inverno os caracteres reprodutivos indicaram aumento de atividade do oviduto e conseqüentemente, retomada da fase reprodutiva. As estações de máxima hipertrofia das glândulas exócrina também corresponderam as estações inverno e primavera, corroborando o período de maior atividade ovidutal. Desta forma, *M. altirostris* apresenta o ciclo reprodutivo sazonal de curta duração, abrangendo aproximadamente duas estações, meados do inverno e ao longo da primavera. Esses resultados também coincidem com o período ovulatório relatado para a população de *M. altirostris* distribuída na Argentina, ocorrendo em novembro e janeiro (Rodríguez et al., 2018).

A espécie *M. ibiboboca* também apresentou o ciclo reprodutivo diferente do padrão

descrito para o grupo, as fêmeas exibiram folículos em vitelogênese secundária, do final do inverno ao longo da primavera (setembro a dezembro). Na primavera verificamos que os caracteres reprodutivos apresentavam fase ativa do oviduto e a presença glândulas tubulares ciliadas com grânulos no útero. Assim, indicando a fase reprodutiva das fêmeas na primavera. No verão observamos que a maioria dos espécimes apresentavam uma diminuição na atividade ovidutal, devido a regressão dos caracteres reprodutivos. Porém, algumas fêmeas ainda exibiam parte dos caracteres do oviduto ativos, indicando que o verão é um período de transição para a fase não reprodutiva. No outono verificamos atividade reduzida do oviduto, o epitélio não mostrou a presença de células secretoras, houve baixa concentração glandular exócrina e estas em estado de hipotrofia, e poucos pontos de secreção foram evidenciados no lúmen. Logo, a espécie exibia a fase não reprodutiva no outono. No inverno as fêmeas apresentaram a retomada dos caracteres reprodutivos, e conseqüentemente maior atividade ovidutal. Além disso, no período do inverno constatamos a máxima hipertrofia das glândulas exócrinas, esse dado corrobora a caracterização da fase reprodutiva para espécie nesta estação. Assim, *M. ibiboboca* possui um ciclo reprodutivo sazonal, de curta duração, abrangendo as estações inverno e primavera.

As espécies *M. altirostris* e *M. ibiboboca* possuem o padrão de ciclo reprodutivo sazonal de curta duração, diferindo do padrão de outras espécies do grupo BRT. O padrão de ciclo de longa duração foi descrito para a *M. frontalis* que apresenta um ciclo extenso de aproximadamente 9 meses (Bassi, Coeti, and Almeida-Santos, 2020) e *M. lemniscatus* com oito meses de fase reprodutiva (Coeti, 2016). Aparentemente para o clado BRT existem dois padrões de ciclo, o de curta duração abrangendo as estações inverno e primavera; e o de longa duração com período de três estações, como evidenciado na espécie amazônica *M. surinamensis*. O padrão de longa duração de ciclo foi evidenciado na espécie *Micrurus surinamensis*, que exibe um ciclo reprodutivo de maior duração, as fêmeas apresentaram

vitelogenese secundária nas estações primavera, outono e final do inverno (abril a novembro). Fêmeas com ovos no oviduto ocorreram na primavera (outubro a dezembro). Os caracteres reprodutivos analisados ao longo do ano, indicaram que os períodos de alta atividade do oviduto ocorreram nas estações primavera, verão e outono. Havendo um padrão na regressão dos caracteres reprodutivos nos espécimes coletados no inverno, pela diminuição da atividade do epitélio infundibular e uterino, das glândulas exócrina que exibiam hipotrofia, e baixa quantidade de secreção no lúmen ovidutal. Desta forma, compomos a fase reprodutiva abrangendo três estações (primavera, verão e outono), o que caracteriza na espécie *M. surinamensis* para nível individual o ciclo reprodutivo contínuo e para categoria populacional como ciclo sazonal semi-sincronizado (extenso).

A espécie *M. paraensis* pertencente a linhagem BRM exhibe similaridade na estratégia de ciclo reprodutivo com outras espécies do grupo. Em *Micrurus paraensis* identificamos folículos em vitelogenese secundária ocorrendo na primavera (outubro-novembro). Os caracteres reprodutivos referentes ao pico de atividade do oviduto foi constatado na primavera, coincidindo com o período de vitelogenese secundária, ou seja, nesta estação as fêmeas estão na fase reprodutiva. No verão a morfologia ovidutal apresentava sinais de baixa atividade, porém mesmo havendo pouca secreção luminal, o útero aglandular exibia alta concentração de TCGs na lâmina própria. No outono os caracteres do oviduto ainda exibiam sinais de fase não reprodutiva, e em meados do inverno, alguns caracteres do epitélio e das glândulas exócrinas sinalizavam retomada de atividade. Desta forma, a fase reprodutiva para a espécie *M. paraensis* ocorre do final do inverno e ao longo da estação primavera. Para a categoria individual o ciclo pode ser classificado como descontínuo, e para população como sazonal semi-sincronizado de curta duração.

As espécies da linhagem BRM apresentam as mesmas características de padrão do ciclo reprodutivo, exibindo como estratégia um curto período de fase reprodutiva. Existe uma

tendencia das espécies direcionarem a ocorrência do evento ovulatório na estação da primavera. Para a espécie *M. paraensis* pertencente ao bioma Amazônia, mesmo não havendo o registro de fêmeas com ovos no oviduto, os maiores folículos em vitelogênese secundária ocorreram na primavera. *M. corallinus* espécie pertencente ao bioma Mata Atlântica, exibe duas estações de fase reprodutiva primavera e verão, com ovulação ocorrendo em ambas as estações (Bassi, Coeti, and Almeida-Santos, 2020). As espécies *M. fulvius* ocorre em região de pradarias e *M. tener* distribuída na floresta temperada, ambas com distribuição geográfica nos Estados Unidos, possuem praticamente o mesmo período de ciclo reprodutivo, vitelogênese secundária ocorrendo de abril a julho (primavera, hemisfério norte) e ovulação de maio a julho (primavera e início do verão, hemisfério norte) (Quinn, 1979; Jackson and Franz, 1981).

As diferenças no padrão de duração da fase reprodutiva, está interligado com fatores evolutivos da espécie e intrinsecamente com as condições fenológicas de temperatura, umidade e fotoperíodo (Taylor and DeNardo, 2011; García-Cobos, Crawford, and Ramírez-Pinilla, 2021). Existem alguns *trade-offs* entre o custo de sobrevivência no período reprodutivo (vitelogênese avançada), em relação com o investimento no sucesso reprodutivo futuro (Vitt, 1992; Shine, 2003). As espécies do grupo BRM apresentam o índice de dimorfismo sexual positivo, indicando que as fêmeas exibem maior tamanho de comprimento rostro-cloacal, em relação aos machos (Marques, Pizzatto, and Almeida-Santos, 2013). O maior comprimento das fêmeas tende a proporcionar maior espaço anatômica para alocação dos ovos, gerando um maior potencial de reprodutivo (i.e., maior número de filhotes por ninhada) e, como resultado, alterando a fecundidade da espécie (Seigel and Ford, 1987; Shine, 1994; Rivas and Burghardt, 2001). Logo, a conservação do padrão de ciclo reprodutivo de curta duração pelo grupo BRM, possivelmente seja uma estratégia que auxilie a na conservação de energia, concentrando os eventos de ovulação e a eclosão dos filhotes para o

período mais quente do ano (verão). A termorregulação das fêmeas com temperaturas mais elevadas, favorece a um desenvolvimento mais rápido dos filhotes, reduzindo o tempo no qual as fêmeas estão mais pesadas (período pré-ovulatório), favorece a menor exposição da fêmea à predadores e diminui o gasto energético na locomoção (Shine, 1980, 2003; Rivas and Burghardt, 2001).

*Micrurus altirostris* apresenta baixo padrão de atividade inverno (Marques, Almeida-Santos, and Rodrigues, 2006). As serpentes que possuem o padrão de atividade sazonal, podem ser influenciadas por fatores abióticos como temperatura e pluviosidade (Hartmann, Hartmann, and Martins, 2009). A flutuação da temperatura ao longo das estações, bem como da luminosidade (glândula pineal), atuam como marcadores de tempo para reprodução e as baixas temperaturas afetam diretamente o metabolismo das serpentes (Licht, 1972; Lillywhite, 1987; Taylor and DeNardo, 2011).

O hábito semi-fossorial das cobras corais possibilita a busca por refúgio contra predadores (ao se enterrarem no solo), e ao mesmo tempo, permite a essas espécies caçarem o alimento que é composto geralmente por anfisbenídeos, cecílias e outras serpentes (Roze, 1996; Campbell and Lamar, 2004). O modo de vida fossorial (ou semi-fossorial) proporciona estratégias diferenciadas de termorregulação, pois existe um aproveitamento no uso do substrato pelos animais ectotérmicos, que ao se deslocarem verticalmente no solo, podem buscar a melhor temperatura dentro do gradiente existente (Lopez, Civantos, and Martín, 2002; Matias and Verrastro, 2018).

Outro fator ecológico que deve ser considerado é a flutuação na oferta de alimento no ambiente, durante as estações do ano. Marques et al. (2006) relataram que o padrão de atividade, nas espécies de *Micrurus*, também pode ser diretamente influenciado pela disponibilidade de alimento ao longo tempo. Os anfisbenídeos e outras espécies serpentiformes apresentam maior atividade no período chuvoso e quente (primavera e verão),

e redução nos períodos de baixa umidade e temperatura (Navega-Gonçalves and Benites, 2019). Assim, considerando-se a diminuição da temperatura média do bioma Pampa (abaixo de 15 C° no inverno), baixas temperaturas também reduzem o padrão de atividade dos anfisbenídeos, principalmente na superfície, ficando estes entocados em galerias e menos expostos aos predadores.

O bioma Caatinga pode apresentar variações no período de estiagem, aproximadamente de seis a oito meses (Ab'Sáber, 2007), acontecendo geralmente de maio a outubro (Barros, Rojas, and Almeida-Santos, 2014b; Braz, Kasperoviczus, and Guedes, 2019). No qual algumas regiões do semiárido, distantes da zona de restinga, podem exibir secas mais rigorosas (Albuquerque et al., 2018). Esse intenso período de estiagem pode causar um estresse fisiológico em diversos grupos de animais (vertebrados e invertebrados), promovendo a migração na busca de enclaves de mata com maior umidade, redução do número de indivíduos e alta taxa de mortalidade (Rodrigues, 2003; Sales et al., 2011).

A queda de temperatura na região do Pampa (inverno) e o longo período de estiagem na Caatinga são condições únicas destes biomas. Pois interferem diretamente no padrão de atividade (metabolismo), e indiretamente na disponibilidade de alimento nessa época. Assim, considerando-se essas variáveis climáticas, a manutenção de um amplo período de fase reprodutiva, iria requerer um alto custo energético. Porém, mesmo havendo uma diminuição do padrão de atividade em *M. altirostris* e menores condições de disponibilidade de alimento para *M. ibiboboca*, as fêmeas de ambas as espécies acabam direcionando o investimento energético para reprodução, o que é evidenciado pela retomada dos caracteres reprodutivos no inverno.

O grupo BRT apresentou maior flexibilidade no padrão de ciclo reprodutivo, *M. altirostris* e *M. ibiboboca* exibem como estratégia um curto período de fase reprodutiva. Os biomas de distribuição destas duas espécies mostram fatores abióticos que podem agir como

limitantes no padrão de atividade, e conseqüentemente na aquisição de alta quantidade de energia, o que influencia no tipo de estratégia de ciclo reprodutivo adotado.

Para a espécie *M. surinamensis*, presente no bioma Amazônia com baixa amplitude térmica e índice de pluviosidade bem distribuído ao longo do ano (Roze, 1996; Campbell and Lamar, 2004), as condições tropicais de temperatura e umidade são favoráveis para um padrão de atividade homogêneo entre as estações (Girons, 1982; Seigel and Ford, 1987). Diferente da maioria das espécies de *Micrurus*, *M. surinamensis* possui o hábito semi-aquático, uma dieta predominantemente composta por peixes (Campbell and Lamar, 2004; Almeida et al., 2016; Silva et al., 2018). A presença de peixes na dieta corresponde a ingestão de grande quantidade de calorias e, ao mesmo tempo, o ambiente amazônico proporciona uma alta diversidade de espécies de peixes. O padrão de ciclo reprodutivo sazonal e extenso, presente em *M. surinamensis*, *M. frontalis* e *M. lemniscatus* evidencia maior investimento de energia para reprodução. A fêmea apresentando diferentes épocas para ocorrência do evento ovulatório, mostra uma flexibilização para início do novo ciclo reprodutivo.

A época do acasalamento em *M. altirostris*, *M. surinamensis* e *M. ibiboboca* ocorreu dentro do período de fase reprodutiva das fêmeas, no qual os folículos estavam em vitelogênese secundária. Observamos que *M. altirostris* apresenta como estratégia um extenso período de acasalamento, que pode ocorrer em qualquer época do ano. Esse resultado obtido com a análise histológica, das porções do útero e vagina, coincidem com os registros de combate nas quatro estações do ano, entre os machos da espécie (Almeida-Santos, Coeti, and Bassi, 2021). Para *M. ibiboboca* e *M. surinamensis* observamos a estratégia de um curto período de acasalamento.

Em comum a época do acasalamento, constatamos o período de maior incidência de glândulas tubulares ciliadas (TCG) armazenando grânulos (útero aglandular), sendo respectivamente as estações, primavera para *M. surinamensis* e *M. altirostris*, e inverno para

*Micrurus ibiboboca*. Os grânulos presentes nos receptáculos indicaram a presença de mucopolissacarídeos neutros e polissacarídeos ácidos, a secreção destes carboidratos pelos receptáculos no exato período de acasalamento mostra relação de sincronia com a atividade ovidutal. Os grânulos armazenados pelos receptáculos (antes da cópula) em *Micrurus*, indicam um preparo prévio à época do acasalamento. Esse padrão observado converge para ideia dos grânulos secretados servirem para atrair os espermatozoides para os receptáculos, e uma vez internalizados, os grânulos ricos em carboidratos poderiam ser utilizados como fonte de fonte de energia (Siegel et al., 2011a; Bassi, Coeti, and Almeida-Santos, 2020).

O grupo BRM apresenta o dimorfismo sexual de comprimento, as fêmeas exibem comprimento rostro-cloacal maior que os machos, e para o grupo BRT ocorre o inverso, os machos geralmente exibem Crc maior que o das fêmeas (Marques, Pizzatto, and Almeida-Santos, 2013). Ao relacionarmos a média de Crc das fêmeas entre as espécies, verificamos não haver um padrão por linhagem, a variações consideráveis entre as espécies (cf., Silva Jr., Pires, and Feitosa, 2016). Entretanto, ao examinarmos o tamanho com o qual os filhotes atingem a maturidade, constatamos que as espécies pertencentes ao clado BRM atingem a maturidade com menor comprimento, *M. paraensis* atinge a maturidade com 424 mm Crc (presente trabalho) e *M. corallinus* com 425 mm (Marques, 1996). E quando comparado com a maturidade das espécies tríades, apenas *M. altirostris* possui a maturidade menor 500 mm.

Os parâmetros reprodutivos como e.g., fecundidade, tamanho, número e massa dos filhotes, estão diretamente relacionados com o tamanho da fêmea. As fêmeas que atingem a maturidade sexual, com o corpo mais largo e com maior comprimento (resultando em maior espaço na cavidade abdominal), proporcionam condições de potencializar a fecundidade, com maior número e armazenando de ovos (Rivas and Burghardt, 2001; Shine, 2003). Das espécies analisadas *M. surinamensis* apresentou a menor fêmea madura com 776 mm de Crc, sendo esse o maior valor entre as espécies. Fêmeas que não estão na fase reprodutiva tendem

a apresentar maior frequência na alimentação ingestão de alimento, interferindo no custo reprodutivo (Bonnet et al., 2000). Enquanto o estresse na alimentação pode acarretar uma defasagem no crescimento (Greene, 1997; Santos et al., 2005). Possivelmente o hábito semiaquático de *M. surinamensis*, e a possibilidade de uma dieta rica em peixes, tenha propiciado as condições para essa estratégia. Desta forma, futuros trabalhos são necessários para investigar a influência da alimentação na fecundidade e na maturação dos filhotes.

#### 4.2 - Estratégia de estocagem dos espermatozoides

A primeira proposta sugerindo a ocorrência de estocagem nas fêmeas de *Micrurus*, foi relatada em *M. tener*, devido à dessincronia entre a época de cópula com o período da ovulação (Quinn, 1979). Posteriormente, a hipótese também foi sugerida para as espécies do grupo BRT, sendo proposto que a estratégia de estocagem deveria ser um padrão na linhagem (Marques, Pizzatto, and Almeida-Santos, 2013). Bassi et al. (2020) comprovaram a estocagem de espermatozoides pelas fêmeas de *M. frontalis* e *M. corallinus*, em receptáculos especializados denominado como glândulas tubulares ciliadas no útero aglandular e relataram a ocorrência das estruturas de estocagem (TCGs) no infundíbulo posterior sem espermatozoides. Pela localização das TCGs no infundíbulo, os mesmos autores, propuseram a hipótese da ocorrência das estratégias de estocagem de longa e curta duração em *Micrurus*.

No presente trabalhos constatamos a presença de estocagem de espermatozoides em receptáculos especializados localizados no útero posterior, nas espécies de *M. paraensis*, *M. altirostris*, *M. surinamensis* e *M. ibiboboca*. E pela primeira vez, em uma espécie da família Elapidae comprovamos a ocorrência da estocagem no infundíbulo posterior. Os SSr do infundíbulo posterior foram evidenciados nas espécies *M. altirostris* e *M. surinamensis*, apenas três exemplares de um total de 140 espécimes de *Micrurus* exibiram essa condição,

indicando ser um evento de curta duração. E pelo fato de dois dos três exemplares estarem com folículos vitelogênicos em estado pré-ovulatório e com a presença de espermatozoides no lúmen ovidutal, podemos inferir que a cópula e uma estocagem são recentes. Essa evidencia das estruturas de estocagem no infundíbulo, armazenando efetivamente os espermatozoides, corrobora a hipótese levantada por Bassi et al. (2020), indicando que as estratégias de estocagem, de curta e longa duração ocorrem nas espécies do gênero *Micrurus* de ambas as linhagens (BRM e BRT), e não apenas no grupo BRT.

A especialização da glândula ovidutal ocorre, por exemplo, quando além da atividade secretora esta passa a realizar a nova função, no caso, a de armazenamento dos espermatozoides (Angelini and Ghiara, 1984; Perkins and Palmer, 1996; Jones, 2011). O receptáculo de estocagem pode mostrar variações quanto a localização, densidade, tamanho, e morfologia no oviduto (Fox, 1956; Eckstut et al., 2009; Holt and Lloyd, 2010; Holt and Fazeli, 2016). Existe algumas variações na nomenclatura glandular, mas as glândulas de estocagem podem apresentar a seguinte morfologia: **glândula tubular simples até tubular ramificada** em *Philodryas patagoniensis* (Rojas, Barros, and Almeida-Santos, 2015), *Erythrolamprus miliaris* (Loebens et al., 2017; Rojas, Barros, and Almeida-Santos, 2017), *Agkistrodon piscivorus* (Siegel et al., 2009a); **glândula alveolar simples até alveolar composta**, em *Diadophis punctatus* (Perkins and Palmer, 1996), *Tantilla coronata* (Aldridge, 1992) ; e **glândula alveolar ramificada composta**, em *Thamnophis elegans* (Siegel et al., 2011a).

A diferença entre as estratégias de estocagem, está relacionada à funcionalidade do receptáculo (Fox, 1956; Halpert, Garstka, and Crews, 1982; Siegel et al., 2011a), conforme: (i) posição estratégica para o espermatozoide fecundar o oócito; (ii) no tempo de permanência que os espermatozoides ficam alocados no receptáculo; (iii) atividade secretora do receptáculo, para manutenção do espermatozoide.

A estocagem de curta duração (cf., Fox, 1956; Halpert, Garstka, and Crews, 1982; Rojas, Barros, and Almeida-Santos, 2015), ocorre nos receptáculos localizados no infundíbulo posterior e sua posição cranial ao oviduto, favorece a fecundação. Devido à espessura delgada da porção infundibular (funil), as estruturas dos SSr são abertas no processo de captação do oócito (ovulação), ou seja, o período de armazenamento dos espermatozoides acaba sendo de curta duração.

Na estocagem de longa duração (cf., Halpert, Garstka, and Crews, 1982; Perkins and Palmer, 1996; Siegel et al., 2011), o armazenamento ocorre em duas regiões, primeiramente no útero aglandular no qual os receptáculos são preenchidos na primeira oportunidade de cópula. E após o processo de ovulação, os receptáculos mantêm a estocagem para o ciclo reprodutivo seguinte, no qual em um segundo momento, os espermatozoides são liberados (SSr do útero aglandular) na época pré-ovulatória e ascendem o oviduto para os TCGs localizados no infundíbulo posterior. Nesse segundo ponto de estocagem, no momento da captação do oócito, o tecido infundibular é esticado, desestabilizando os SSr e liberando os espermatozoides para a fecundação.

A estocagem de longa duração foi relatada em *M. corallinus* e *M. frontalis* pela observação de SSr em período posterior à época do acasalamento, receptáculos em atividade liberando grânulos de secreção e estocagem em fêmeas apresentando vitelogênese primária (Bassi, Coeti, and Almeida-Santos, 2020). Os mesmos pontos foram constatados nas espécies *M. altirostris*, *M. surinamensis*, *M. paraensis* e *M. ibiboboca*, comprovando a ocorrência da estratégia de estocagem de espermatozoides por longa duração nessas espécies. O armazenamento de espermatozoides por um longo período, permite a fêmea diversas vantagens que potencializam o sucesso reprodutivo, como a possibilidade de múltiplas cópulas, a seleção espermática do melhor macho (Duvall, Arnold, and Schuett, 1992; Birkhead, 1995) do melhor que pode acarretar em diferentes paternidades e um aumento na

variabilidade genética (Birkhead, 1995; Shine, 2003; Friesen, Kahrl, and Olsson, 2020). Além disso, adicionamos uma nova importância dessa estratégia para o grupo *Micrurus*, com base nas características do ciclo reprodutivo de diferentes espécies do gênero, em diferentes trabalhos (cf., Marques, 1996; Marques, Pizzatto, and Almeida-Santos, 2013; Coeti, 2016; Bassi, Coeti, and Almeida-Santos, 2020), observamos que a maioria das fêmeas na estação reprodutiva estão em vitelogênese primária, e não apresentam sinais de corpo lúteo (ou albicans) no ovário. Logo, esse é um indicativo que provavelmente as fêmeas não apresentem um ciclo anual, pois se assim o fosse, o número de fêmeas com ovos no oviduto ou com folículos em vitelogênese secundária, deveria ser maior do que é evidenciado nos trabalhos. Desta forma, nossa hipótese é que as fêmeas apresentem um ciclo bienal ou trienal. Assim, em ciclos ovulatório mais longos (e.g., bienais), a estocagem por um período extenso torna-se fundamental para ocorrência de fecundação e manter o sucesso reprodutivo, garantindo a escolha dos gametas dos melhores machos para gerar a próxima ninhada (Birkhead and Møller, 1993).

Diferente das estruturas especializadas para estocagem (receptáculos), o armazenamento de espermatozoides também pode acontecer em dobras ou sulcos do epitélio, em criptas profundas ou apenas ficar retido no lúmen da junção útero-vaginal (Perkins and Palmer, 1996; Blackburn, 1998; Siegel et al., 2011a), porém por curto período de tempo. Além disso, na região da JUV os espermatozoides podem ficar retidos no lúmen, pela ocorrência da torção muscular uterina UMT (Almeida-Santos and Salomão, 1997; Salomão and Almeida-Santos, 2002). Essa variação morfofuncional do oviduto foi descrita para diversas espécies da família Viperidae, gêneros *Crotalus* e *Bothrops* (Almeida-Santos and Salomão, 1997, 2002; Barros, Rojas, and Almeida-Santos, 2014a, 2014b; Silva et al., 2019) e recentemente no grupo *Lachesis* (de Souza and Almeida-Santos, 2020).

A modificação anatômica na porção distal do útero aglandular (junção útero-vaginal), das espécies *M. altirostris*, *M. ibiboboca* e *M. surinamensis* da linhagem BRT, apresenta uma morfologia helicoidal e se assemelha com a conformação da Torção Muscular Uterina (UMT), descrita por Almeida-Santos and Salomão (2002) e renomeada de *Uterine Muscular Coiling* (UMC) por Muniz-Da-Silva et al. (2018). Entretanto, o UMC das espécies de *Micrurus* possuía uma morfologia discreta e de curto comprimento. Possivelmente a estrutura do UMC seja de ocorrência sazonal, pois a maioria das fêmeas analisadas exibiam o oviduto liso (sem ondulações). Funcionalmente o UMC é estimulado por fatores hormonais, de forma a promover a retenção dos espermatozoides, vivos e viáveis até o pré-ovulatório (Almeida-Santos and Salomão, 2002; Schuett et al., 2002). A presença dos espermatozoides no lúmen uterino (porção helicoidal), com a matriz carreadora (massa gelatinosa), corrobora a hipótese de uma retenção dos gametas nessa região do oviduto com UMC. Porém, outras análises são necessárias para investigar a ocorrência do UMC em outras espécies do gênero *Micrurus*, correlacionando essa estratégia com a variação hormonal e a sazonalidade dentro do ciclo reprodutivo.

#### **4.3 – Conclusão**

A estratégia de ciclo reprodutivo apresenta-se conservado na linhagem BRM, como característica o grupo possui um ciclo sazonal de curta duração, abrangendo duas estações. No clado BRT há a ocorrência de dois padrões de ciclo produtivo sazonal, o de curta duração apresentado por *M. ibiboboca* e *M. altirostris*, e o padrão de ciclo de extensa duração, superior a 7 meses, como observado *M. surinamensis*. Existe uma tendência da primavera ser o período reprodutivo e ovulatório das fêmeas, e conseqüentemente, a época de eclosão dos filhotes acaba ocorrendo no verão, no período mais quente do ano.

As espécies de ambos os clados apresentaram em comum, a estratégia de estocagem de espermatozoides de curta e longa duração. A estocagem foi constatada em glândulas alveolares compostas apresentando ductos ciliados, na lâmina própria do infundíbulo posterior, e em glândulas tubulares ciliadas no útero aglandular. Algumas fêmeas de *M. surinamensis*, *M. ibiboboca* e *M. altirostris* exibiram na porção distal do útero aglandular, a morfologia helicoidal do oviduto, característico da estratégia de estocagem nomeada de UMC. A estrutura do UMC, em um dos espécimes de *M. altirostris*, possuía espermatozoides agregados a uma matriz carreadora (massa gelatinosa) no lúmen. Essa estrutura não foi evidenciada em *M. paraensis*.

*M. altirostris* apresentou como estratégia uma época de acasalamento extensa, ocorrendo em qualquer estação do ano, esse dado coincide com os períodos de combate, relatados na literatura para a espécie. Essa estratégia potencializa o número de cópulas que a fêmea pode ter ao longo do ano, aumentando o sucesso reprodutivo, porém o investimento energético para reprodução acaba sendo maior para ambos os sexos. Em *M. ibiboboca* e *M. surinamensis* o período evidenciado de acasalamento foi de duas estações, sendo caracterizado como estratégia de curto período de acasalamento.

## REFERÊNCIAS

- Ab'Sáber, A.N. (2007): Os Domínios de Natureza no Brasil. Potencialidades Paisagísticas. Ateliê Editorial.
- Albuquerque, R.L., Santos Protázio, A. Dos, Barbosa De Queiroga Cavalcanti, L., Lopez, L.C.S., Mesquita, D.O. (2018): Geographical ecology of *Tropidurus hispidus* (Squamata: Tropiduridae) and *Cnemidophorus ocellifer* (Squamata: Teiidae) in a neotropical region: a comparison among atlantic forest, caatinga, and coastal populations. *J. Herpetol.* **52**: 145–155.
- Aldridge, R.D. (1992): Oviductal anatomy and seasonal sperm storage in the southeastern crowned snake (*Tantilla coronata*). *Copeia* **1992**: 1103–1106.
- Almeida-Santos, S.M., Braz, H.B., Santos, L.C., Sueiro, L.R., Barros, V.A., Rojas, C.A., Kasperoviczus, K.N. (2014): Biologia reprodutiva de serpentes : recomendações para a coleta e análise de dados. *Herpetol. Bras.* **3**: 14–24.
- Almeida-Santos, S.M., Salomão, M.G. (1997): Long-term sperm storage in the female Neotropical Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). *Japanese J. Herpetol.* **17**: 46–52.
- Almeida-Santos, S.M., Salomão, M.G. (2002): Reproduction in neotropical pitvipers , with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: *Biology of the Viper*, p. 445–462. Campbell, J.A., Brodie, E.D., Eds. Eagle Mountain Pub Lc.
- Almeida-Santos, S.M., Coeti, R.Z., Bassi, E.A. (2021): Reproductive strategies of new world coralsnakes. In: *Advances in Coralsake Biology*, p. 335–352. Silva Jr., N.J. Da, Aird, S.D., Prudente, A.L.D.C., Eds. Goiânia, Puc Goiás.
- Almeida, P.C.R., Prudente, A.L.D.C., Curcio, F.F., Rodrigues, M.T. (2016): Biologia e história natural das cobras-corais. In: *As cobras corais do Brasil biologia, taxonomia e envenenamento*, p. 169–215. Silva Jr., N.J. Da, Ed. Goiânia, Puc Goiás.
- Angelini, F., Ghiara, G. (1984): Reproductive modes and strategies in vertebrate evolution. *Bolletino Di Zool.* **51**: 121–203.
- Barros, V.A., Rojas, C.A., 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. *Herpetol. J.* **24**: 41–49.
- Barros, V.A., Rojas, C.A., Almeida-Santos, S.M. (2014b): Reproductive Biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. *Adv. Zool.* **2014**: 1–11.
- Bassi, E.A., Coeti, R.Z., Almeida-Santos, S.M. De (2020): Reproductive cycle and sperm storage of female coral snakes, *Micrurus corallinus* and *Micrurus frontalis*. *Amphib. Reptil.* **41**: 13–27.
- Bassi, E.A., Oliveira, C. de, Braz, H.B., Almeida-Santos, S.M. de (2018): How Does Oocyte Uptake Occur? A Macroscopic Study of the Ovarian and Oviductal Modifications for Egg Capture in the Coral-Snake *Micrurus corallinus*. *Anat. Rec.* **301**: 1936–1943.
- Birkhead, T.R. (1995): Sperm competition: Evolutionary causes and consequences. *Reprod. Fertil. Dev.* **7**: 755–775.
- Birkhead, T.R., Møller, A.P. (1993): Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. *Biol. J. Linn. Soc.* **50**: 295–311.
- Blackburn, D.G. (1998): Structure, function, and evolution of the oviducts of squamate reptiles, with

special reference to viviparity and placentation. *J. Exp. Zool.* **282**: 560–617.

Bonnet, X., Naulleau, G., Shine, R., Lourdais, O. (2000): Reproductive versus ecological advantages to larger body size in female snakes, *Vipera aspis*. *Oikos* **89**: 509–518.

Braz, H.B., Kasperoviczus, K.N., Guedes, T.B. (2019): Reproductive Biology of the fossorial snake *Apostolepis gaboii* (Elapomorhini): a threatened and poorly known species from the Caatinga region. *South Am. J. Herpetol.* **14**: 37–47.

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

Coeti, R.Z. (2016): Biologia reprodutiva da cobra coral verdadeira *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758) (Squamata: Elapidae). Universidade de São Paulo.

Costa, H.C., Bérnils, R.S. (2018): Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: lista de espécies. *Rev. Herpetol. Brasileira* **7**: 11–57.

Duvall, D., Arnold, S.J., Schuett, G.W. (1992): Pitviper mating systems: ecological potential, sexual selection, and microevolution. In: *Biology of the Pitvipers*, p. 321–336. Campbell, J.A., Brodie Jr., E.D., Eds. Selva Publishing.

Eckstut, M.E., Sever, D.M., White, M.E., Crother, B.I. (2009): Phylogenetic analysis of sperm storage in female Squamates. In: *Animal Reproduction: New Research Developments*, p. 185–218. Dahnof, L.T., Ed. New York, USA, Nova Science Publishers,.

Fox, H. (1977): Urinogenital System. In: *Biology of the Reptilia Volume 6. Morphology*, p. 81–96. Gans, C., Parsons, T.S., Eds. London and New York., Academic Press,.

Fox, W. (1956): Seminal receptacles of snakes. *Anat. Rec.* **124**: 519–539.

Friesen, C.R., Kahrl, A.F., Olsson, M. (2020): Sperm competition in squamate reptiles: Sperm competition in lizards and snakes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **375**.

García-Cobos, D., Crawford, A.J., Ramírez-Pinilla, M.P. (2021): Reproductive phenology in a neotropical aquatic snake shows marked seasonality influenced by rainfall patterns. *J. Nat. Hist.* **54**: 1845–1862.

Girling, J.E. (2002): The reptilian oviduct: a review of structure and function and directions for future research. *J. Exp. Zool.* **293**: 141–170.

Girons, H. Saint (1982): Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycles. *Herpetologica* **38**: 5–16.

Greene, H.W. (1997): *Snakes: the evolution of mystery in nature*. London, England.

Halpert, A.P., Garstka, W.R., Crews, D. (1982): Sperm transport and storage and its relationship to the annual cycle of the female red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*. *J. Morphol.* **174**: 149–159.

Hartmann, P.A., Hartmann, M.T., Martins, M. (2009): Ecologia e história natural de uma taxocenose de serpentes no núcleo Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar, no sudeste do Brasil. *Biota Neotrop.* **9**: 173–184.

Holt, W. V., Fazeli, A. (2016): Sperm storage in the female reproductive tract. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **4**: 291–310.

- Holt, W. V., Lloyd, R.E. (2010): Sperm storage in the vertebrate female reproductive tract: How does it work so well? *Theriogenology* **73**: 713–722.
- Jackson, D.R., Franz, R. (1981): Ecology of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) in northern peninsular Florida. *Herpetologica* **37**: 213–228.
- Jones, S.M. (2011): Hormonal regulation of ovarian function in reptiles. In: *Hormones and Reproduction of Vertebrates*, p. 89–114. Norris, D.O., Lopez, K.H., Eds. London, UK, Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Junqueira, L.C.U. (1995): Histology revisited—Technical improvement promoted by the use of hydrophilic resin embedding. *Ciênc Cult* **47**: 92–95.
- Licth, P. (1972): Environmental physiology of reptilian breeding cycles: role of temperature. *Gen. Comp. Endocrinol.* **3**: 477–488.
- Lillywhite, H.B. (1987): Temperature, energetics and physiological ecology. In: *Snakes: Ecology and Evolutionary Biology*, p. 422–477. Seigel, R.A., Collings, J.T., Novak, S.S., Eds. New York, USA, MacMillan Publishing.
- Loebens, L., Rojas, C.A., Almeida-Santos, S.M., Cechin, S.Z. (2017): Reproductive biology of *Philodryas patagoniensis* (Snakes: Dipsadidae) in south Brazil: Female reproductive cycle. *Acta Zool.* 1–10.
- Lopez, P., Civantos, E., Martín, J. (2002): Body temperature regulation in the amphisbaenian *Trogonophis wiegmanni*. *Can. J. Zool.* **80**: 42–47.
- Marques, O.A.V. (1996): Reproduction, seasonal activity and growth of the coral snakes, *Micrurus corallinus* (Elapidae), in the southeastern Atlantic forest in Brazil. *Amphibia-Reptilia* **17**: 277–285.
- Marques, O.A.V., Almeida-Santos, S.M., Rodrigues, M.G. (2006): Activity patterns in coral snakes, genus *Micrurus* (Elapidae), in south and southeastern Brazil. *South Am. J. Herpetol.* **1**: 114–120.
- Marques, O.A.V., Pizzatto, L., Almeida-Santos, S.M. (2013): Reproductive strategies of new world coral snakes, genus *Micrurus*. *Herpetologica* **69**: 58–66.
- Mathies, T. (2011): Reproductive cycles of tropical snakes. In: *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*, p. 511–550. Aldridge, R.D., Sever, D.M., Eds. Science Publishers,.
- Matias, N.R., Verrastro, L. (2018): Thermal biology of *Amphisbaena munoai* (Squamata: Amphisbaenidae). *Zool.* **35**: 1–9.
- Mendonça, F., Danni-Oliveira, I. moresco (2007): *Climatologia Noções Básicas e Climas do Brasil. Oficina de textos.*
- Muniz-Da-Silva, D.F., Passos, J., Siegel, D.S., Almeida-Santos, S.M. (2018): Caudal oviduct coiling in a viperid snake, *Crotalus durissus*. *Acta Zool.* **101**: 1–9.
- Navega-Gonçalves, M.E.C., Benites, J.P. de A. (2019): Amphisbaenia: adaptações para o modo de vida fossorial. *Rev. Bras. Zootecias* **20**: 1–30.
- Nogueira, C.C., Argôlo, A.J.S., Arzamendia, V., Azevedo, J.A., Barbo, F.E., Bérnils, R.S., Bolochio, B.E., Borges-Martins, M., Brasil-Godinho, M., Braz, H., Buononato, M.A., Cisneros-Heredia, D.F., Colli, G.R., Costa, H.C., Franco, F.L., Giraud, A., Gonzalez, R.C., Guedes, T., Hoogmoed, M.S., Marques, O.A.V., Montingelli, G.G., Passos, P., Prudente, A.L.C., Rivas, G.A., Sanchez, P.M., Serrano, F.C., Silva, N.J., Strüssmann, C., Vieira-Alencar, J.P.S., Zaher, H., Sawaya, R.J., Martins, M.

- (2019): Atlas of Brazilian Snakes: Verified Point-Locality Maps to Mitigate the Wallacean Shortfall in a Megadiverse Snake Fauna. *South Am. J. Herpetol.* **14**: 1–274.
- Perkins, M.J., Palmer, B.D. (1996): Histology and functional morphology of the oviduct of an oviparous snake, *Diadophis punctatus*. *J. Morphol.* **227**: 67–79.
- Quinn, H.R. (1979): Reproduction and growth of the Texas coral snake (*Micrurus fulvius tenere*). *Copeia* **1979**: 453–463.
- Rivas, J.A., Burghardt, G.M. (2001): Understanding sexual size dimorphism in snakes: wearing the snake's shoes. *Anim. Behav.* **62**: 1–6.
- Rodrigues, M.T. (2003): Herpetofauna da Caatinga. In: *Ecologia e Conservação Da Caatinga*, p. 181–236. Leal, I.R., Tabarelli, M., Silva, J.M.C. Da, Eds. Universidade Federal de Pernambuco.
- Rodríguez, M.E., Arzamendia, V., Bellini, G.P., Giraud, A.R. (2018): Natural history of the threatened coral snake *Micrurus altirostris* (Serpentes: Elapidae) in Argentina. *Rev. Mex. Biodivers.* **89**: 1255–1262.
- 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.
- Rojas, C.A., Barros, V.A., Almeida-Santos, S.M. (2017): A histological and ultrastructural investigation of the female reproductive system of the water snake (*Erythrolamprus miliaris*): Oviductal cycle and sperm storage. *Acta Zool.* 1–12.
- Roze, J.A. (1996): *Coral Snakes of the Americas - Biology, identification, and venoms*. Florida, Krieger Publishing Company.
- Sales, R.F.D., Ribeiro, L.B., Jorge, J.S., Freire, E.M.X. (2011): Habitat use, daily activity periods, and thermal ecology of *Ameiva ameiva* (Squamata: Teiidae) in a caatinga area of northeastern Brazil. *Phyllomedusa* **10**: 165–176.
- Salomão, M.G., Almeida-Santos, S.M. (2002): The reproductive cycle in male neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). In: *Biology of the Vipers*, p. 507–514. Eagle Mountain, Utah., Eagle Mountain Publishing.
- Santos, X., Llorente, G.A., Feriche, M., Pleguezuelos, J.M., Casals, F., Sostoa, A. de (2005): Food availability induces geographic variation in reproductive timing of an aquatic oviparous snake (*Natrix maura*). *Amphibia-Reptilia* **26**: 183–191.
- Schuett, G.W., Carlisle, S.L., Holycross, A.T., O'Leile, J.K., Hardy-Sr, D.L., Kirk, E. a Van, Murdoch, W.J. (2002): Mating system of male Mojave rattlesnakes (*Crotalus scutulatus*): seasonal timing of mating, agonistic behavior, spermatogenesis, sexual segment of the kidney. *Biol. Vipers* 515–532.
- Seigel, R.A., Ford, N.B. (1987): Reproductive ecology. In: *Snakes: Ecology and Evolutionary Biology*, p. 210–252. Seigel, R.A., Collins, J.T., Novak, S.S., Eds. New York, USA, Mac-millan.
- Shine, R. (1977): Reproduction in Australian elapid snakes II. Female reproductive cycles. *Aust. J. Zool.* **25**: 655–666.
- Shine, R. (1980): "Costs" of reproduction in reptiles. *Oecologia* **46**: 92–100.
- Shine, R. (1994): Sexual size dimorphism in snakes revisited. *Copeia* **2**: 326–346.

- Shine, R. (2003): Reproductive strategies in snakes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **270**: 995–1004.
- Siegel, D.S., Miralles, A., Chabarría, R.E., Aldridge, R.D. (2011): Female reproductive anatomy: cloaca, oviduct, and sperm storage. In: *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*, p. 347–409. Aldridge, R.D., Sever, D.M., Eds. New Hampshire, Science Publishers.
- Siegel, D.S., Server, D.M., Rheubert, J.L., Gribbins, K.M. (2009): Reproductive biology of *Agkistrodon piscivorus* lacépède (Squamata, Serpentes, Viperidae, Crotalinae). *Herpetol. Monogr.* **23**: 74–107.
- Siegel, D.S., Sever, D.M. (2008): Seasonal variation in the oviduct of female *Agkistrodon piscivorus* (Reptilia:Squamata): An ultrastructural investigation. *J. Morphol.* **269**: 980–997.
- Silva, F.M., Prudente, A.L. da C., Machado, F.A., Santos, M.M., Zaher, H., Hingst-Zaher, E. (2018): Aquatic adaptations in a Neotropical coral snake: A study of morphological convergence. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **56**: 382–394.
- Silva Jr., N.J. Da, Buononato, M.A., Feitosa, D.T. (2016): As cobras-corais do novo mundo. In: *As cobras corais do Brasil biologia, taxonomia e envenenamento*, p. 47–78. Silva Jr., N.J. Da, Ed. Goiás, Editora da Puc Goiás.
- Silva Jr., N.J. Da, Pires, M.G., Feitosa, D.T. (2016): Diversidade das cobras-corais do Brasil. In: *As cobras corais do Brasil biologia, taxonomia e envenenamento*, p. 79–167. Silva Jr., N.J. Da, Ed. Goiânia, GO, Puc Goiás.
- Silva, K.M.P., Silva, K.B., Sueiro, L.R., Oliveira, M.E.E.S., Almeida-Santos, S.M. (2019): Reproductive Biology of *Bothrops atrox* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) from the Brazilian Amazon. *Herpetologica* **75**: 198–207.
- Souza, E. de, Almeida-Santos, S.M. (2020): Reproduction in the bushmaster (*Lachesis muta*): uterine muscular coiling and female sperm storage. *Acta Zool.* 1–12.
- Taylor, E.N., DeNardo, D.F. (2011): Hormones and reproductive cycles in snakes. In: *Hormones and Reproduction of Vertebrates*, p. 355–372. Norris, D.O., Lopez, K.H., Eds. London, UK, Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Vitt, L.J. (1992): Diversity of Reproductive Strategies Among Brazilian Lizards and Snakes: The Significance of Lineage and Adaptation. In: *Reproductive Biology of South American Vertebrates*, p. 135–149. Hamlett, W.C., Ed. New York, USA, Springer-Verlag.

## CONCLUSÃO GERAL

As espécies de cobra coral do grupo BRM apresentaram conservação das estratégias reprodutivas, os eventos reprodutivos exibiram similaridade na duração e no período de ocorrência. Os machos e fêmeas possuem um ciclo reprodutivo sazonal, com período de espermiogênese e de fase reprodutiva de curta duração. Os machos exibem intensa produção de espermatozoides, em um período que antecede a época de acasalamento e como estratégia, esse grupo apresenta elevado armazenamento de espermatozoides do ducto deferente. Enquanto as fêmeas apresentam o período ovulatório (ou de fase reprodutiva) direcionado para estação da primavera.

No clado BRT as espécies apresentaram ciclo reprodutivo sazonal, porém constatamos maior variabilidade dos padrões reprodutivos, mostrando maior plasticidade no grupo. Espécies que exibiram maior investimento na reprodução, indicado por ciclos de longa duração. E espécies que concentram os caracteres reprodutivos (ou fase reprodutiva) em duas estações, indicando um ciclo de curta duração. As fêmeas de ambos os clados apresentam uma tendência do padrão ovulatório ocorrer na estação da primavera. As estratégias de estocagem de espermatozoides de curta e longa duração, foram comprovadas, pela presença de SSr no infundíbulo posterior e útero aglandular. Pela primeira vez em espécies da família Elapidae constatamos a estrutura do UMC na posição distal do útero aglandular, nas espécie *M. altirostris*, *M. surinamensis* e *M. ibiboboca*. As diferenças de estratégias reprodutivas observadas no grupo BRT, como em *M. surinamensis* e *M. altirostris*, podem estar relacionadas as diferentes condições ambientais que o bioma Amazônia e o bioma Pampa apresentam, assim como o próprio hábito alimentar dessas espécies. Esses resultados mostram uma maior sensibilidade e adaptação dessa linhagem.

A espécie *M. altirostris* exhibe como estratégia um amplo período de acasalamento, no qual a cópula pode ocorrer em qualquer época do ano. Enquanto as espécies *M. ibiboboca*, *M. surinamensis* e *M. paraensis*, o período de cópula geralmente tem a duração de duas estações. Pela análise do ciclo reprodutivo das fêmeas, verificamos que possivelmente o período ovulatório das fêmeas não seja anual, indicando assim que esse evento reprodutivo seja bienal. Desta forma, o papel da estocagem de espermatozoides pelas fêmeas torna-se fundamental para potencializar o sucesso reprodutivo no grupo.

A estocagem de espermatozoides de longa duração, no útero aglandular, pode proporcionar maior competição espermática, nas sucessivas cópulas que a fêmea tenha ao longo de cada ciclo reprodutivo, aumentando assim a variabilidade genética de sua ninhada.

Futuras pesquisas são de grande necessidade para investigar outras questões relacionadas ao grupo *Micrurus*, como a evolução dos padrões reprodutivos das cobras corais; análise morfofuncional das estruturas dos receptáculos de estocagem (fêmea) e ducto deferente (*ampulla*) com microscopia eletrônica; além de investigar questões relacionadas SSK, avaliando por imuno-histoquímica a sinalização celular do SSK e dos grânulos de secreção com os receptores de membrana dos espermatozoides.

## REFERÊNCIAS

- Ab'Sáber, A.N. (2007): Os Domínios de Natureza no Brasil. Potencialidades Paisagísticas. Ateliê Editorial.
- Aldridge, R.D., Siegel, D.S., Goldberg, S.R., Pyron, R.A. (2020): Seasonal timing of spermatogenesis and mating in Squamates: A reinterpretation. *Copeia* **108**: 231.
- Almeida-Santos, S.M., Aguiar, L.F.S. De, Balestrin, R.L. (1998): *Micrurus frontalis* (Coral Snake) Male Combat. *Herpetol. Rev.* 4: 242.
- Almeida-Santos, S.M., Braz, H.B., Santos, L.C., Sueiro, L.R., Barros, V.A., Rojas, C.A., Kasperoviczus, K.N. (2014): Biologia reprodutiva de serpentes : recomendações para a coleta e análise de dados. *Herpetol. Bras.* 3: 14–24.
- Almeida-Santos, S.M., Salomão, M.G. (1997): Long-term sperm storage in the female Neotropical Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). *Japanese J. Herpetol.* **17**: 46–52.
- Almeida-Santos, S.M., Salomão, M.G. (2002): Reproduction in neotropical pitvipers , with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: *Biology of the Viper*, p. 445–462. Campbell, J.A., Brodie, E.D., Eds. Eagle Mountain Pub Lc.
- Almeida-Santos, S.M., Coeti, R.Z., Bassi, E.A. (2021): Reproductive strategies of new world coralsnakes. In: *Advances in Coralsake Biology*, p. 335–352. Silva Jr., N.J. Da, Aird, S.D., Prudente, A.L.D.C., Eds. Goiânia, Puc Goiás,.
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, Paulo Cesar Gonçalves, J.L.D.M., Sparovek, G. (2013): Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Zeitschrift* **22**: 711–728.
- Alves, F.Q., Argôlo, a J.S., Carvalho, G.C. (2014): Reproductive biology of the bushmaster *Lachesis muta* (Serpentes: Viperidae) in the Brazilian Atlantic Forest. *Phyllomedusa* **13**: 99–109.
- Angelini, F., Ghiara, G. (1984): Reproductive modes and strategies in vertebrate evolution. *Bolletino Di Zool.* **51**: 121–203.
- Angilletta Jr., M.J., Niewiarowski, P.H., Navas, C.A. (2002): The Evolution of Thermal Physiology in ectotherms. *J. Therm. Biol.* **2**: 249–268.
- Barros, V.A., Rojas, C.A., 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. *Herpetol. J.* **24**: 41–49.
- Barros, V.A., Rojas, C.A., Almeida-Santos, S.M. (2014b): Reproductive Biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. *Adv. Zool.* **2014**: 1–11.
- Barros, V.A., Rojas, C.A., Almeida-Santos, S.M. (2017): Mating plugs and male sperm storage in *Bothrops cotiara*. *Herpetol. J.* **27**: 63–67.
- Bernarde, P.S. (2011): Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. *Gaz. Médica Da Bahia* **85**: 55–63.
- Blackburn, D.G. (1998): Structure, function, and evolution of the oviducts of squamate reptiles, with special reference to viviparity and placentation. *J. Exp. Zool.* **282**: 560–617.
- Blackburn, D.G., Stewart, J.R. (2011): Viviparity and Placentation in Snakes. In: *Reproductive*

- Biology and Phylogeny of Snakes, p. 119–181. Aldridge, R.D., Sever, D.M., Eds. Science Publishers,.
- Braz, H.B., Scartozzoni, R.R., Almeida-Santos, S.M. (2016): Reproductive modes of the South American water snakes: A study system for the evolution of viviparity in squamate reptiles. *Zool. Anzeiger - A J. Comp. Zool.* **263**: 33–44.
- Brown, A.G.P., Shine, R. (2006): Why Do Most Tropical Animals Reproduce Seasonally? Testing Hypotheses on an Australian Snake Published by : Ecological Society of America content in a trusted digital archive . We use information technology and tools to increase productivity and facilita. *Ecology* **87**: 133–143.
- Brown, G.P., Shine, R. (2002): Reproductive ecology of a tropical natricine snake, *Tropidonophis mairii* (Colubridae). *J. Zool.* **258**: 63–72.
- Campbell, J.A., Lamar, W.W. (2004): The venomous reptiles of the western hemisphere. Ithaca, United States, Cornell University Press.
- Ceolin, M.F. (2000): Mar de palavras: Poesias reunidas. p. 1-39. Ed. Sinpro ABC.
- Clark, R.W., Schuett, G.W., Repp, R. a., Amarello, M., Smith, C.F., Herrmann, H.-W. (2014): Mating Systems, Reproductive Success, and Sexual Selection in Secretive Species: A Case Study of the Western Diamond-Backed Rattlesnake, *Crotalus atrox*. *PLoS One* **9**: e90616.
- Costa, H.C., Bérnils, R.S. (2018): Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: lista de espécies. *Rev. Herpetol. Brasileira* **7**: 11–57.
- Cunha, O.R. da, Nascimento, F.P. (1978): Ofídios da Amazônia X - as cobras da região leste do Pará. Museu Paraense Emílio Goeldi.
- Eckstut, M.E., Sever, D.M., White, M.E., Crother, B.I. (2009): Phylogenetic analysis of sperm storage in female Squamates. In: *Animal Reproduction: New Research Developments*, p. 185–218. Dahnof, L.T., Ed. New York, USA, Nova Science Publishers,.
- Fox, H. (1977): Urinogenital System. In: *Biology of the Reptilia Volume 6. Morphology*, p. 81–96. Gans, C., Parsons, T.S., Eds. London and New York., Academic Press,.
- Fox, W. (1956): Seminal receptacles of snakes. *Anat. Rec.* **124**: 519–539.
- 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. *Biol. J. Linn. Soc.* **109**: 893–907.
- Girons, H. Saint (1982): Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycles. *Herpetologica* **38**: 5–16.
- Greene, H.W. (1997): *Snakes: the evolution of mystery in nature*. London, England.
- Holt, W. V., Fazeli, A. (2016): Sperm storage in the female reproductive tract. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **4**: 291–310.
- James, C., Shine, R. (1985): The seasonal timing of reproduction: A tropical-temperate comparison in Australian lizards. *Oecologia* **67**: 464–474.
- Loebens, L., Almeida-Santos, S.M., Cechin, S.Z. (2020): Reproductive biology of the Sword Snake *Tomodon dorsatus* (Serpentes: Dipsadidae) in South Brazil: comparisons within the tribe Tachymenini. *Amphibia-Reptilia* 1–15.

- Loebens, L., Cechin, S.Z., Theis, T.F., Moura, L.B., Almeida-Santos, S.M. (2016): Reproductive biology of *Philodryas patagoniensis* (Snakes: Dipsadidae) in south Brazil: male reproductive cycle. *Acta Zool.* 1–11.
- Loebens, L., Rojas, C.A., Almeida-Santos, S.M., Cechin, S.Z. (2017): Reproductive biology of *Philodryas patagoniensis* (Snakes: Dipsadidae) in south Brazil: Female reproductive cycle. *Acta Zool.* 1–10.
- Marques, O.A.V. (1996): Reproduction, seasonal activity and growth of the coral snakes, *Micrurus corallinus* (Elapidae), in the southeastern Atlantic forest in Brazil. *Amphibia-Reptilia* **17**: 277–285.
- Marques, O.A.V., Almeida-Santos, S.M., Rodrigues, M.G. (2006): Activity patterns in coral snakes, genus *Micrurus* (Elapidae), in south and southeastern Brazil. *South Am. J. Herpetol.* **1**: 114–120.
- Mathies, T. (2011): Reproductive cycles of tropical snakes. In: *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*, p. 511–550. Aldridge, R.D., Sever, D.M., Eds. Science Publishers,.
- Mendonça, F., Danni-Oliveira, I. moresco (2007): *Climatologia Noções Basicas e Climas do Brasil. Oficina de textos.*
- Nogueira, C.C., Argôlo, A.J.S., Arzamendia, V., Azevedo, J.A., Barbo, F.E., Bérnils, R.S., Bolochio, B.E., Borges-Martins, M., Brasil-Godinho, M., Braz, H., Buononato, M.A., Cisneros-Heredia, D.F., Colli, G.R., Costa, H.C., Franco, F.L., Giraud, A., Gonzalez, R.C., Guedes, T., Hoogmoed, M.S., Marques, O.A.V., Montingelli, G.G., Passos, P., Prudente, A.L.C., Rivas, G.A., Sanchez, P.M., Serrano, F.C., Silva, N.J., Strüssmann, C., Vieira-Alencar, J.P.S., Zaher, H., Sawaya, R.J., Martins, M. (2019): Atlas of Brazilian Snakes: Verified Point-Localities Maps to Mitigate the Wallacean Shortfall in a Megadiverse Snake Fauna. *South Am. J. Herpetol.* **14**: 1–274.
- Pizzatto, L., Almeida-Santos, S.M. de, Marques, O.A.V. (2007): Biologia reprodutiva de serpentes brasileiras. In: *Herpetologia No Brasil II*, p. 201–221. Nascimento, L.B., Oliverira, M.E. de, Eds. Puc Minas,.
- Pizzatto, L., Marques, O.A. V. (2006): Interpopulational Variation in Reproductive Cycles and Activity of the Water Snake *Liophis miliaris* (Colubridae) in Brazil. *Herpetol. J.* **16**: 353–362.
- Pough, F.H. (1980): The University of Chicago The Advantages of Ectothermy for Tetrapods. *Am. Soc. Nat.* **115**: 92–112.
- Resende, F.C. De, Nascimento, L.B. (2015): The Female Reproductive Cycle of the Neotropical Snake *Atractus pantostictus* (Fernandes and Puerto, 1993) from South-eastern Brazil. *J. Vet. Med.* **44**: 225–235.
- Rivas, J.A., Burghardt, G.M. (2001): Understanding sexual size dimorphism in snakes: wearing the snake's shoes. *Anim. Behav.* **62**: 1–6.
- 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. *J. Morphol.* **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.
- Roze, J.A. (1996): *Coral Snakes of the Americas - Biology, identification, and venoms.* Florida, Krieger Publishing Company.
- Santos, X., Llorente, G.A., Feriche, M., Pleguezuelos, J.M., Casals, F., Sostoa, A. de (2005): Food

availability induces geographic variation in reproductive timing of an aquatic oviparous snake (*Natrix maura*). *Amphibia-Reptilia* **26**: 183–191.

Seigel, R.A., Ford, N.B. (1987): Reproductive ecology. In: *Snakes: Ecology and Evolutionary Biology*, p. 210–252. Seigel, R.A., Collins, J.T., Novak, S.S., Eds. New York, USA, Mac-millan.

Sever, D.M., Hamlett, W.C. (2002): Female sperm storage in reptiles. *J. Exp. Zool.* **292**: 187–199.

Shine, R. (1987): The evolution of viviparity: ecological correlates of reproductive mode within a genus of Australian snakes (Pseudechis: Elapidae). *Copeia* **3**: 551–563.

Shine, R. (1994): Sexual size dimorphism in snakes revisited. *Copeia* **2**: 326–346.

Shine, R. (2003): Reproductive strategies in snakes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **270**: 995–1004.

Siegel, D.S., Miralles, A., Chabarria, R.E., Aldridge, R.D. (2011a): Female reproductive anatomy: cloaca, oviduct, and sperm storage. In: *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*, p. 347–409. Aldridge, R.D., Sever, D.M., Eds. New Hampshire, Science Publishers,.

Siegel, D.S., Trauth, S.E., Sever, D.M., Aldridge, R.D. (2011b): The phylogenetic distribution of the ampulla ureter and ampulla urogenital/uriniferous papilla in the Serpentes. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **49**: 160–168.

Silva Jr., N.J. Da, Buononato, M.A., Feitosa, D.T. (2016): As cobras-corais do novo mundo. In: *As Cobras Corai do Brasil, biologia, taxonomia e envenenamento*, p. 47–78. Silva Jr., N.J. Da, Ed. Goiás, Editora da Puc Goiás,.

Silva, K.M.P., Braz, H.B., Kasperoviczus, K.N., Marques, O.A.V., Almeida-Santos, S.M. (2020): Reproduction in the pitviper *Bothrops jararacussu*: large females increase their reproductive output while small males increase their potential to mate. *Zoology* **142**: 125816.

Silva, K.M.P., Silva, K.B., Sueiro, L.R., Oliveira, M.E.E.S., Almeida-Santos, S.M. (2019): Reproductive Biology of *Bothrops atrox* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) from the Brazilian Amazon. *Herpetologica* **75**: 198–207.

Slowinski, J.B. (1995): A Phylogenetic Analysis of the New World Coral Snakes (Elapidae: *Leptomicrurus*, *Micruroides*, and *Micrurus*) Based on Allozymic and Morphological Characters. *J. Herpetol.* **29**: 325–338.

Stahlschmidt, Z.R., DeNardo, D.F. (2011): Parental Care in Snakes. In: *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*, p. 673–702. Aldridge, R.D., Sever, D.M., Eds. Science Publishers,.

Vitt, L.J., Caldwell, J.P. (2009): *Herpetology: An introduction biology of amphibians and reptiles*. California, Academic Press is an imprint of Elsevier.

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. *Gen. Comp. Endocrinol.* **139**: 151–157.

Zaher, H., Graziotin, F., Prudente, A.L.D.C., Silva Jr., N.J. Da (2016): Origem e evolução dos Elapideos e das cobras-corais. In: *As Cobras Corais-Corais Do Brasil Biologia, Taxonomia e Envenenamento*, p. 25–45. Editora da Puc Goiás.