

A influência de variações climáticas no ciclo reprodutivo de corais verdadeiras *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis*

ERICK AUGUSTO BASSI

MESTRADO

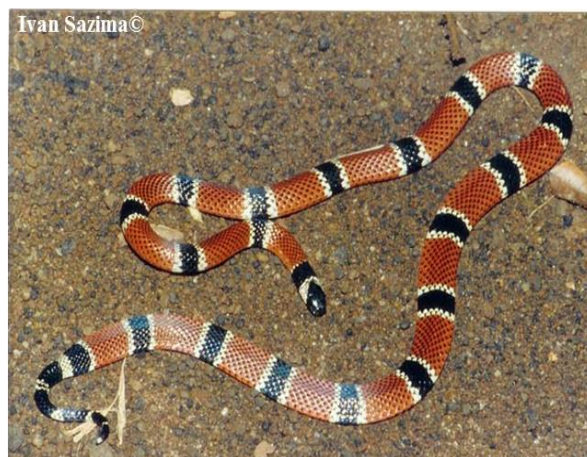
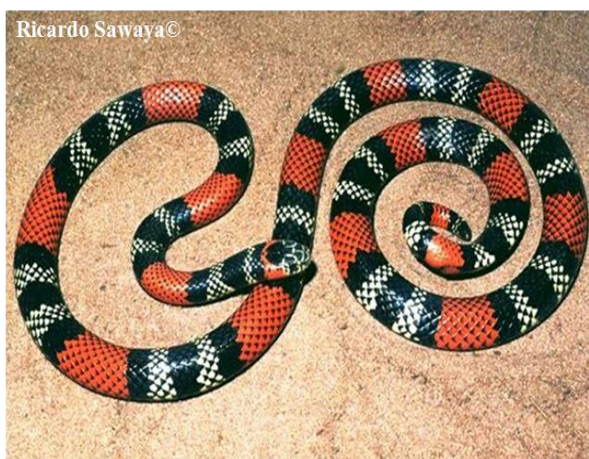
**PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL**



**Biologia
Estrutural**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Unesp
Programa de pós-graduação em Biologia Animal

**A influência de variações climáticas no ciclo reprodutivo
de corais verdadeiras *Micrurus corallinus* e *Micrurus
frontalis***



Aluno: Erick Augusto Bassi

Orientadora: Dra. Selma Maria de Almeida Santos

São José do Rio Preto
2016

ERICK AUGUSTO BASSI

**A influência de variações climáticas no ciclo reprodutivo
de corais verdadeiras *Micrurus corallinus* e *Micrurus
frontalis***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre 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.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Maria de Almeida Santos

**São José do Rio Preto
2016**

Bassi, Erick Augusto.

A influência de variações climáticas no ciclo reprodutivo de corais verdadeiras *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis* / Erick Augusto Bassi. -- São José do Rio Preto, 2016
111 f. : il., tabs.

Orientador: Selma Maria de Almeida Santos
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Ecologia animal. 2. Cobra - Reprodução. 3. *Micrurus*. 4. Cobra - Comportamento. 5. Mudanças climáticas. I. Almeida-Santos, Selma Maria de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 598.12

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

Banca Examinadora

Titulares

Profa. Dra. Selma Maria Almeida-Santos (Orientadora) _____

Instituto Butantan – São Paulo/ SP

Prof. Dr. Otavio Augusto Vuolo Marques _____

Instituto Butantan – São Paulo/ SP

Prof. Dr. Claudio Augusto Rojas _____

UNIFESP – São Paulo/ SP

Suplentes

Profa. Dra. Letícia Ruiz Sueiro _____

Universidade de Guarulhos/ SP
Instituto Butantan – São Paulo/ SP

Profa. Dra. Maria José de Jesus Silva _____

Instituto Butantan – São Paulo/ SP

São José do Rio Preto, 12 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

Bem chegada a hora... agora é agradecer a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram na minha vida e conseqüentemente para a realização desta dissertação. Como sempre um triste hábito de deixar as coisas para última hora, provavelmente eu esqueça de algumas pessoas importantes mas faz parte.

Agradeço imensamente a Deus por me ajudar nos momentos difíceis, por me dar ânimo e coragem para aceitar aquilo que eu não posso mudar. A gente vai apreendendo que muitas vezes a vida é implacável em nos entristecer mas ao mesmo tempo há alegria em cada nuance da vida, basta ver o lado cheio do copo. Mesmo tendo perdido a minha irmã no final do meu mestrado, ela sempre olhou o lado cheio do copo nas pessoas, assim tentei seguir com as coisas do mestrado e com a vida.

Aos meus pais Cassio e Elizabeth que foram fundamentais na minha formação, pela preocupação e carinho sempre demonstrados; a minha irmã Ingrid pela paciência e bondade em suas ações, agradeço porque as memórias sempre me são alegres e me dão ânimo para continuar.

Ao meu tio Valter Nunes Bassi por se importar com o meu futuro, me incentivando a alcançar os meus objetivos e por servir de exemplo na minha vida.

A minha orientadora Profa. Dra. Selma Maria de Almeida Santos pela oportunidade de trabalhar no laboratório, por acreditar no projeto, pela paciência em me orientar, pelo carinho e confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Classius de Oliveira por me coorientar indiretamente, me ajudando, dando suporte laboratorial, por mostrar preocupação na condução dos experimentos e principalmente por me acolher no laboratório.

A Dra. Eliane Gonçalves Freitas pela ajuda com sugestões e correções do projeto para Fapesp, o que foi fundamental para a conquista da bolsa.

Aos professores da biologia que tive na graduação (UEL), em especial a Profa. Celia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade que sempre me instigou com suas aulas e por me entusiasmar a continuar com a biologia. A Profa. Ângela Teresa Silva e Souza pela amizade,

preocupação, por ser um exemplo de pesquisadora, pela habilidade de mostrar a nós mesmos, que podemos sempre sermos melhores através da com dedicação e perseverança.

Aos curadores das coleções biológicas pela solicitude na utilização dos exemplares de coral verdadeira.

Aos meus grandes amigos de Londrina Ebola (Danilin), Alexandre (Xandão), Dennys (Buda), que mesmo longe são fundamentais para a minha sanidade mental, trazendo felicidade nas conversas, pelas sugestões e pelo prosear sempre bem-vindo, acompanhado de um tererê. Aos novos amigos de Rio Preto (cidade do calor sem limites!), Felipe (Dorigão), Mada, Blah, Pakito, Mini, Bitoca, Larinha, Goulart, Lidi e Emily.

Aos meus queridos amigos de república Rodrigo (Negão), Ferzinha, Ferzona, Maurício, Mônica e Vagner. Não tem nada melhor do que chegar em casa e ter a galera (família) para te animar.

Aos amigos e Time de Handebol Unesp/Rio Preto, juntos fomos campeões do Interunesp e não tem nada melhor do que fazer o que gosta e ainda ser campeão.

Aos pesquisadores e amigos do laboratório de anatomia do IBILCE/UNESP, ao Grupo de Estudos de Reprodução de Squamata (GERES-Butantan), em especial a Verônica por ajudar no projeto para Fapesp com correções e sugestões; a Livia por me ensinar a fazer mapas e climogramas; e a Rafaela pela troca de ideias sobre o grupo *Micrurus*.

E a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa concedida! (Processo Fapesp 2014/12813-9).

“The greatest act can be one little victory” (Banda Rush)

Dedicatória

Em memória de Ingrid Evelyn Bassi,
que sempre demonstrou um imenso
carinho e um sorriso alegre ao seu
irmão rabugento.

Em memória de Cassio Nunes Bassi
(chefão) um pai, um herói, um amigo
e um exemplo.

RESUMO

O ciclo reprodutivo das serpentes é coordenado evolutivamente por fatores genéticos e sincronizado pelas estações climáticas ao longo do ano. Diferentemente das áreas temperadas, as regiões tropicais não possuem as estações tão marcantes e há uma diversidade de microclimas dentro do mesmo bioma. Não se sabe se estas diferenças de temperatura e pluviosidade, entre locais, são capazes de alterar o ciclo de uma espécie e se estas espécies possuem plasticidade de modificar a estratégia reprodutiva. Para tanto, o presente estudo teve como proposta analisar a influência climática no ciclo reprodutivo da *Micrurus corallinus* e *M. frontalis*, dentro de cada espécie e entre as duas espécies. Os ciclos reprodutivos foram analisados utilizando a biometria e histologia de animais preservados em coleções biológicas. Os resultados obtidos com o trabalho mostraram que a espécie *Micrurus corallinus* possui uma plasticidade para adaptar o ciclo conforme as condições do ambiente. Além disso, neste trabalho há a primeira confirmação da estratégia reprodutiva de estocagem de espermatozoides pelas fêmeas no gênero *Micrurus*.

Palavras-chaves: Reprodução, *Micrurus*, clima, coral-verdadeira, estocagem.

ABSTRACT

The reproductive cycle of snakes are coordinate evolutionarily for genetic factories and synchronize by seasonal weather (four seasons). In the tropical regions, the cold of winter is less marked than temperate zones and there is a diversity microclimate inside of biome. It's uncertainty if the difference of temperature and rainfall are capable to change the reproductive cycle in the specie and if these species has plasticity to modify their reproductive strategies. The aim of this research was analyze the influence of climate variation in reproductive cycle of *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis* inside of each specie and between both species. The reproductive cycle was examined by biometric and histology data from biological collections. The result attained with this search, indicate that *M. corallinus* have a plasticity to adapt the cycle according environment conditions. In addition, the result of this work there is the first confirmation of the reproductive strategy of sperm storage by females in genus *Micrurus*.

Keywords: Reproduction, *Micrurus*, climate, coral-snake, sperm-storage.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	11
Diversidade do grupo Elapidae.....	11
Espécies de corais no Brasil.....	12
Ecofisiologia e biologia reprodutiva.....	13
OBJETIVOS	17
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO I - A influência climática na reprodução das fêmeas de <i>Micrurus corallinus</i> e <i>Micrurus frontalis</i>	22
RESUMO.....	23
INTRODUÇÃO.....	24
MATERIAL E MÉTODOS	29
RESULTADOS.....	35
DISCUSSÃO	61
CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS	70
CAPÍTULO II - Biometria e histologia no ciclo reprodutivo dos machos de <i>Micrurus corallinus</i> e <i>Micrurus frontalis</i>	74
RESUMO.....	75
INTRODUÇÃO.....	76
MATERIAL E MÉTODOS	78
RESULTADOS.....	81
DISCUSSÃO	102
CONCLUSÕES.....	108
REFERÊNCIAS	109

INTRODUÇÃO

DIVERSIDADE DO GRUPO ELAPIDAE

Dentro da ordem Squamata, temos a família Elapidae com diversas espécies espalhadas por quase todos os continentes do planeta, com exceção da Europa (Figura 1). Os membros desta família possuem a denteção proteróglifa, presença das glândulas de veneno, ausência da fosseta loreal e escama loreal, entre a narina e o olho (ROZE, 1996; CAMPBELL e LAMAR, 2004).

As linhagens desta família tiveram diferentes padrões evolutivos (caracteres morfológicos e estratégias) que permitiram a sobrevivência e expansão do grupo ao longo das gerações, padrões estes como: modos reprodutivos ovíparos e vivíparos (SHINE, 1977); a estratégia de apresentar a coloração críptica ou aposemática (SAVAGE e SLOWINSKI, 1992; DA SILVA JR e SITES JR, 2001; SHINE et al., 2014). Podem ser espécies terrestres (SHINE, 1979; VITT e CALDWELL, 2009) aquáticas (MCDOWELL, 1972; GREENE, 1997;) ou semi-fossoriais (ROZE, 1996; CAMPBELL e LAMAR, 2004; MARQUES et al., 2006), de hábito noturno ou diurno.

A família Elapidae passa por algumas divergências em relação a composição e reconhecimento de algumas subfamílias, para alguns autores são considerados seis subfamílias Bungarinae, Calliophinae, Elapinae, Hydrophiinae, Laticaudinae e Maticorinae (MIRZA e PAL, 2010; GUPTHA E RAJASEKHAR, 2011), porém apenas duas subfamílias são amplamente aceitas, subfamílias Elapinae Boie 1827 e Hydrophiinae Fitzinger (MENGDEN, 1983; GREENE, 1997; VITT e CALDWELL, 2009; BURBRINK e CROTHER, 2011).

Dentre os representantes mais conhecidos desta família no mundo, temos: cobra-real (King cobra) *Ophiophagus hannah*, a cobra-cuspideira *Naja ashei*, a cobra-capelo *Naja naja*. As serpentes do gênero *Naja* chamam a atenção por possuírem, em sua morfologia, a capacidade de realizar um achatamento dorso-ventral e expansão das laterais, na região próxima ao crânio (pescoço), formando uma espécie de capuz na cabeça em situações de ataque ou defesa. Assim, temos as serpentes marinhas do gênero *Pelamis*, *Hydrophis* e *Laticauda*, espécies

comuns na Oceania; e por último temos as famosas corais verdadeiras com a coloração aposemática de anéis vermelho, branco, preto ou amarelo distribuídas principalmente no novo mundo.

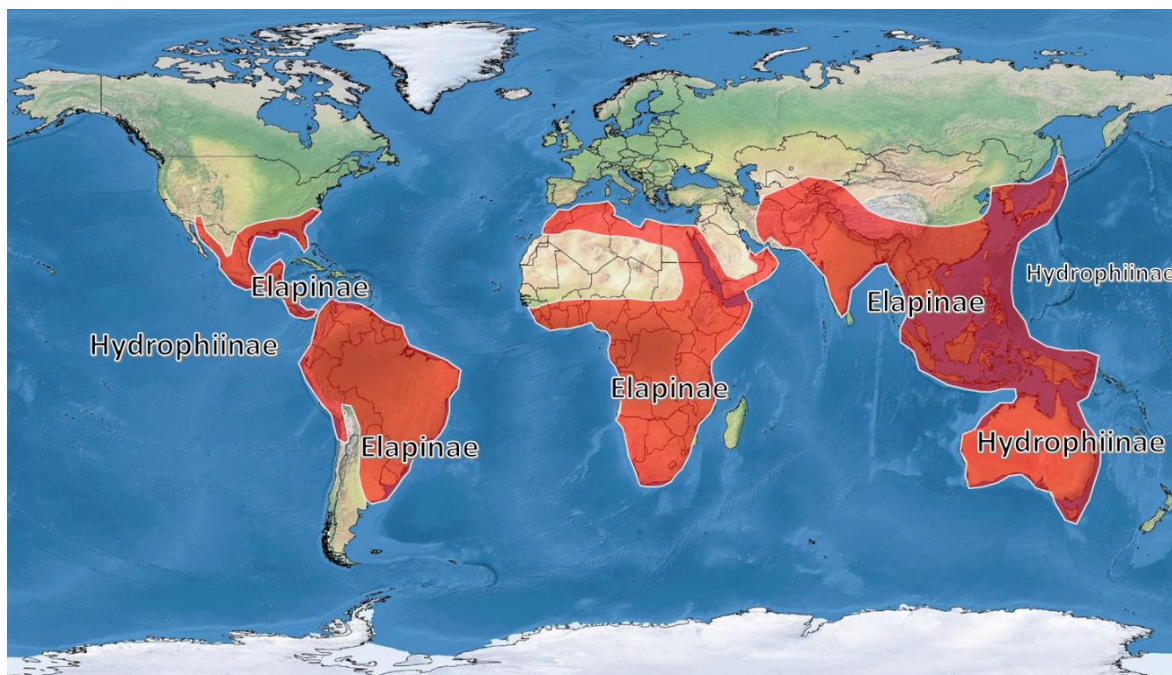


Figura 1. Distribuição das subfamílias Elapinae e Hydrophiinae no globo, segundo a descrição de McDowell (1970).

ESPÉCIES DE CORAIS NO BRASIL

A família Elapidae é representada na Américas do Norte e Sul pelas serpentes corais, que pertencem basicamente a três gêneros *Micruroides*, *Leptomicrurus* e *Micrurus* (CAMPBELL e LAMAR, 2004; SERAFIM et al., 2007; MARQUES et al., 2013). No Brasil estão presentes os gêneros, *Leptomicrurus* com três espécies distribuídas na Amazônia (CAMPBELL e LAMAR, 2004; BERNARDE, 2011); e *Micrurus* com 35 espécies distribuídas pelo Brasil, sendo 8 destas endêmicas (BÉRNILS e COSTA, 2015).

No gênero *Micrurus* existem duas linhagens filogenéticas diferentes, conforme o padrão de coloração (cujas diferenças são suportadas por caracteres morfológicos e moleculares), o grupo de anéis pretos em mônades (BRM) como apresentado por *M. corallinus* e *M. annellatus*; e o grupo de anéis pretos agrupados em tríades (BRT), como observado na *M. frontalis*, *M. altirostris* e *M. ibiboboca*.

(SLOWINSKI, 1995; DA SILVA JR. e SITES JR., 2001, CAMPBELL e LAMAR, 2004).

ECOFISIOLOGIA E BIOLOGIA REPRODUTIVA

Esses animais por serem ectotérmicos são mais sensíveis ao ambiente, desta forma a variação da temperatura corporal, pode alterar diretamente a sua condição ecofisiológica (ANGILLETTA JR et al., 2002; DE MESQUITA et al., 2011). As condições do ambiente como temperatura, períodos de seca e de alto índice pluviométrico; fotoperíodo e disponibilidade de alimento; agiriam diretamente nas condições metabólicas dos répteis e consequentemente na reprodução (FITCH, 1982; VITT e VANGILDER, 1983; GREENE, 1993).

O ciclo reprodutivo nas serpentes abrange o estudo da vitelogênese, ovulação, oviposição, eclosão dos filhotes nos ovos, gametogênese, estratégias de estocagem dos espermatozoides, maturidade sexual e dimorfismo sexual (BLACKBURN, 1998; PIZZATTO et al., 2007; BARROS et al., 2012).

As serpentes podem apresentar diferenças evolutivas em relação a alguns eventos do ciclo reprodutivo (MATHIES, 2011), a grande maioria dos vertebrados possui uma associação do período do acasalamento com a época da ovulação das fêmeas; entretanto algumas espécies de serpentes apresentam uma dissociação do ciclo, ou seja, há uma separação temporal do período da gametogênese, acasalamento e ovulação (fertilização) nas fêmeas (BIRKHEAD e MOLLER, 1993).

Desta forma algumas estratégias reprodutivas foram selecionadas para possibilitar essa separação, dentre estas a possibilidade de estocagem dos espermatozoides (SAINT-GIRONS, 1982), por ambos os sexos. Nas fêmeas a estocagem acontece pela formação de receptáculos ou túbulos de estocagem após a cópula, até o período no qual a fêmea tem ovulação dos folículos vitelogênicos. Nos machos os espermatozoides são armazenados ou estocados na região distal do ducto deferente até o período do acasalamento.

O ciclo reprodutivo pode ser analisado em um nível individual, conforme a produção de gametas; sendo então classificado em descontínuo, contínuo e

acíclico; E posteriormente é feita uma comparação entre os indivíduos classificação assim o modo reprodutivo da espécie como sendo sazonal ou assazonal (MATHIES, 2011).

O ciclo espermatogênico nas serpentes foi primeiramente descrito por Volsoe (1944), posteriormente Saint-Girons (1982) categorizou diferentes padrões do ciclo de espécies de regiões temperadas e tropicais, sendo: Tipo I (pós-nupcial ou dissociado) após o período de cópula, ocorre o aumento da produção dos espermatozoides no período mais quente do ano e estes ficam armazenados no ducto deferente durante o inverno, com as temperaturas mais baixas, até a primavera época da cópula. Tipo II (misto) no final da primavera há um aumento na produção dos espermatozoides, ocorrendo uma interrupção no inverno e término no ano seguinte (este tipo de ciclo pode ser caracterizado para espécies com dois períodos de espermatogênese e cópula). Tipo III (pré-nupcial ou associado) em um período próximo a época acasalamento há um aumento na síntese de espermatozoides e máxima produção neste período. Tipo IV (acíclica) a produção é contínua ao longo de todo o ano.

Segundo Marques (1996) o ciclo da fêmea de *M. corallinus* seria sazonal, com o início da vitelogênese ocorrendo no início da época das chuvas (primavera) e a oviposição no início da estiagem. O macho de *M. corallinus* teria o ciclo pós-nupcial do Tipo I. Por análises morfométricas foi observado um aumento do comprimento testicular no outono e um aumento na largura do ducto deferente no inverno, o que representaria um período de estocagem de espermatozoides no ducto deferente (ALMEIDA-SANTOS et al., 2006).

Em *M. frontalis* foi relatado que a espermatogênese ocorreria entre o final da primavera e o início do verão e foi sugerido que a estocagem de espermatozoides ocorreria na fêmea, seguindo a estratégia reprodutiva das espécies BRT (MARQUES et al., 2013).

Almeida-Santos et al. (2006) descrevam, para *M. corallinus*, a existência de sincronismo dentro dos sexos e uma coordenação do ciclo reprodutivo do macho (pós-nupcial) e da fêmea (pré-nupcial); porém os próprios autores afirmam que os dados mais aprofundados do ciclo são necessários, devido à alta diversidade de

padrões de ciclo dentro do grupo Elapidae, possivelmente por existir regiões climaticamente diferentes nos locais de distribuição deste grupo.

Em fêmeas adultas, pode-se utilizar como parâmetro a medição do maior folículo vitelogênico de cada espécime para se determinar em qual estágio do ciclo reprodutivo a fêmea se encontra (ALMEIDA-SANTOS 2005; PIZZATTO et al., 2007; MUNIZ-DA-SILVA, 2013).

Nos machos, muitos trabalhos utilizam como parâmetro para definir o ciclo o aumento do volume testicular, comparando entre as estações do ano para inferir a espermatogênese. Porém apenas esse tipo de análise pode levar a conclusões erradas em relação ao ciclo (ROJAS et al., 2013; ALMEIDA-SANTOS et al., 2014). Assim, as análises histológicas são imprescindíveis para ter-se a exatidão na correlação e confirmação das etapas da espermatogênese (MATHIES, 2011; MUNIZ-DA-SILVA, 2013; ALMEIDA-SANTOS et al., 2014).

Em Squamata, simultaneamente à espermatogênese ocorre uma modificação nos néfrons do rim, essa modificação é uma hipertrofia das células que compõem o túbulo contorcido distal, nomeado de segmento sexual renal (SSR), no qual há produção de grânulos de secreção; geralmente esse período é concomitante a espermatogênese (ROJAS e ALMEIDA-SANTOS, 2008; GIST, 2011; MUNIZ-DA-SILVA, 2013).

Foram formuladas muitas hipóteses das funções destes grânulos sintetizados pelo SSR, como a participação na produção de ferormônio, ser um integrante na composição do sêmen para manter os espermatozoides vivos no oviduto da fêmea (FOX, 1977; SEVER et al., 2008; GIST, 2011), ter envolvimento em comportamento de corte, guarda copulatória e combate (ALMEIDA-SANTOS et al., 1999; ROJAS e ALMEIDA-SANTOS, 2008).

Devine (1975), descreveu que uma das possíveis funções dos grânulos secretados pelo SSR, a formação de um *plug* copulatório em *Thamnophis* sp., uma massa gelatinosa que impediria a passagem de outros espermatozoides garantindo, assim, a fecundação do primeiro macho que copulou com a fêmea (ROJAS e ALMEIDA-SANTOS, 2008; GIST, 2011).

Portanto, este trabalho teve como proposta investigar as modificações no sistema reprodutor durante o ciclo reprodutivo e por sua vez se há variações no ciclo, conforme as condições de temperatura e pluviosidade na qual encontra-se as

populações. Utilizando para isso dados biométricos e histológicos de espécimes de coleção.

O primeiro capítulo “A influência climática na reprodução das fêmeas de *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis*” apresenta dados inéditos das estratégias reprodutivas adotadas por cada espécie.

O segundo capítulo “Biometria e histologia no ciclo reprodutivo dos machos de *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis*” apresenta uma abordagem comparativa das modificações no sistema reprodutor dos machos durante o ciclo reprodutivo.

2. OBJETIVOS

Neste contexto, com o presente trabalho tem-se por objetivo testar se há efeito das variações climáticas sobre o ciclo reprodutivo de *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis*, dentro de cada espécie e entre as duas espécies, em duas zonas climaticamente diferentes. Utilizando-se, para isso uma análise histológica e morfométrica do aparelho reprodutor e das vias genitais de machos e fêmeas ao longo das quatro estações do ano.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; et al. Predatory combat and tail wrestling in hierarchical contests of the Neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes: Viperidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 20, n. 1, p. 88-96, 1999.

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

ALMEIDA-SANTOS, S.M.; PIZZATTO, L. & MARQUES, O.A.V. Intra-sex synchrony and intersex coordination in the reproductive timing of the coral snake *Micrurus corallinus* (Elapidae). **HERPETOLOGICAL JOURNAL**. Vol. 16, p. 371-376, 2006.

ALMEIDA-SANTOS, S.M.; BRAZ, H.B.; SANTOS, L.C.; SUEIRO, L.R.; BARROS, V.A.; ROJAS, C.A.; KASPEROVICZUS, K.N. Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados. **Herpetologia Brasileira**. V.3, n.1, p.14-24. 2014.

ANGILLET JR, M. J.; NIEWIAROWSKI, P. H.; NAVAS, C.A. The evolution of thermal physiology in ectotherms. **Journal of Thermal Biology**, v. 27, n. 4, p. 249-268, 2002.

APESTEGUÍA, S.; ZAHER, H. A Cretaceous terrestrial snake with robust hindlimbs and a sacrum. **Nature**, v. 440, n. 7087, p. 1037-1040, 2006.

BARROS, V. A.; SUEIRO, L. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of phylogenetic conservatism of reproductive patterns. **The Herpetological Journal**, v. 22, n. 2, p. 97-104, 2012.

BERNARDE, P. S., 2011 Mudanças na Classificação de Serpentes Peçonhentas Brasileiras e suas Implicações na Literatura Médica. **Gazeta Médica da Bahia**. Bahia, v. 81, p.55-63.2011.

BÉRNILS, R. S.; H. C. Costa (org.). Répteis brasileiros: Lista de espécies. Versão 2015.2. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acessada em 30/JUL/2015.

BIRKHEAD, T. R.; MØLLER, A. P. Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 50, n. 4, p. 295-311, 1993.

BLACKBURN, D. G. Structure, function, and evolution of the oviducts of squamate reptiles, with special reference to viviparity and placentation. **Journal of Experimental Zoology**, v. 282, n. 4-5, p. 560-617, 1998

BURBRINK, F. T.; CROTHER, B. I. Evolution and taxonomy of snakes. **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Boca Raton, FL: CRC Press. p, p. 19-53, 2011.

CALDWELL, M. W.; LEE, M. S. Y. A snake with legs from the marine Cretaceous of the Middle East. 1997.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. **New York: Cornell University**. Press. 2004.

DA SILVA JR, N.J.; SITES JR, J. W. Phylogeny of South American triad coral snakes (Elapidae: Micrurus) based on molecular characters. **Herpetologica**, p. 1-22, 2001.

DE MESQUITA, P.aulo Cesar Mattos Dourado et al. Ecology of *Philodryas nattereri* in the Brazilian semi-arid region. **The Herpetological Journal**, v. 21, n. 3, p. 193-198, 2011.

DEVINE, M. C. Copulatory plugs in snakes: enforced chastity. **Science**, v. 187, n. 4179, p. 844-845, 1975.

FITCH, Henry S. Resources of a snake community in prairie-woodland habitat of northeastern Kansas. **Herpetological communities**, p. 83-97, 1982.

FOX, H. The urogenital system of reptiles. Biology of the Reptilia. In: GANS C.; PARSONS T.S. **Biology of the reptilian**. Editora Academic Press. p. 1-157. 1977.

GIST, D.H. Hormones and the sex ducts and sex accessory structures of reptiles In: NORRIS, D.O.; LOPEZ, K.H. **Hormones and Reproduction of Vertebrates**. 1. Ed. San Diego. Elsevier. p. 117-139. 2011.

GUPTHA, B. M.; RAJASEKHAR, M. Sighting of Slender Coral Snake *Calliophis melanurus* in Seshachalam Hills, Eastern Ghats, India: a new record. **Reptile Rap**, v. 12, p. 5-6, 2011.

GREENE, Harry W.; FOGDEN, Michael; FOGDEN, Patricia. **Snakes: the evolution of mystery in nature**. Univ of California Press, 1997.

MARQUES, O.A.V. Reproduction, seasonal activity and growth of the coral snake, *Micrurus corallinus* (Elapidae), in the southeastern Atlantic forest in Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 17, n. 3, p. 277-285, 1996.

MARQUES, O.A.V.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; RODRIGUES, M.G. Activity patterns in coralsnakes, genus *Micrurus* (Elapidae), in south and southeastern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v.1, n.2, p.99-105, 2006.

MARQUES, O. A.V; PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive Strategies of New World Coral Snakes, Genus *Micrurus*. **Herpetologica**, v. 69, n. 1, p. 58-66, 2013.

MARTILL, David M.; TISCHLINGER, Helmut; LONGRICH, Nicholas R. A four-legged snake from the Early Cretaceous of Gondwana. **Science**, v. 349, n. 6246, p. 416-419, 2015.

MATHIES, T. Reproductive cycles of tropical snakes. In *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*, 511–550. Aldridge, R.D. & Sever, D.M. (eds). Enfield: Science Publishers. 2011.

MENGDEN, G. A. **The taxonomy of Australian elapid snakes: a review**. Australian Museum, 1983.

MCDOWELL, S. B. On the status and relationships of the Solomon Island elapid snakes. **Journal of Zoology**, v. 161, n. 2, p. 145-190, 1970.

MCDOWELL, S. B. The genera of sea-snakes of the *Hydrophis* group (Serpentes: Elapidae). **The Transactions of the Zoological Society of London**, v. 32, n. 3, p. 189-247, 1972.

MIRZA, Z.; PAL, S. Notes on the effect of a bite from *Calliophis melanurus* Shaw, 1802 (Serpentes: Elapidae: Calliophinae). **Reptile Rap**, v. 9, p. 7-8, 2010.

MUNIZ-DA-SILVA, D. F.; Ciclo reprodutivo da caninana, *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758) (serpentes:colubridae). Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, SP. 2013.

PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; MARQUES, O. A. V. Biologia reprodutiva de serpentes brasileiras. in: NASCIMENTO, L, B.; OLIVEIRA, M. E. *Herpetologia no Brasil II*. (Eds.). Belo Horizonte: **Sociedade Brasileira de Herpetologia**, P. 201-221. 2007.

PYRON, R. A.; BURBRINK, F. T.; WIENS, J. J. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. **BMC evolutionary biology**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.

ROJAS CA, ALMEIDA-SANTOS SM. 2008. Influência do ciclo do segmento sexual renal na determinação do acasalamento em *Sibynomorphus mikanii* (dormideira) (Serpentes, Dipsadinae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, p.154-156. 2008.

ROZE, J.A. Coral Snakes of the Americas: Biology, Identification and Venoms. **Krieger Publishing Company**, USA. 1996.

SAVAGE, J. M.; SLOWINSKI, J. B. The colouration of the venomous coral snakes (family Elapidae) and their mimics (families Aniliidae and Colubridae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 45, n. 3, p. 235-254, 1992.

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

SERAFIM, H.; PECCININI-SEALE, D. M.; BATISTIC, R. F. Estudo cariotípico de duas espécies brasileiras do gênero *Micrurus* (Ophidia: Elapidae). **Biota Neotropica**, v. 7, n. 1, p. 75, 2007.

SEVER, D. M.; SIEGEL, D. S.; BAGWILL, A.; ECKSTUT, M. E.; ALEXANDER, L., CAMUS, A.; MORGAN, C. Renal sexual segment of the cottonmouth snake,

Agkistrodon piscivorous (Reptilia, Squamata, Viperidae). **Journal of Morphology**, v. 269, n. 6, p. 640-653, 2008.

SHINE, R. Reproduction in Australian elapid snakes. II. Female reproductive cycles. *Australian Journal of Zoology* 25:655–666. 1977.

SHINE, R. Activity patterns in australian elapid snakes (Squamata: Serpentes: Elapidae). **Herpetologica**, p. 1-11, 1979.

SHINE, R.; SPENCER, C. L.; KEOGH, J. S. Morphology, reproduction and diet in Australian and Papuan death adders (*Acanthophis*, Elapidae). **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e94216, 2014.

SLOWINSKI, J. B. A phylogenetic analysis of the New World coral snakes (Elapidae: *Leptomicrurus*, *Micruroides*, and *Micrurus*) based on allozymic and morphological characters. **Journal of Herpetology**, p. 325-338, 1995.

VITT, L. J.; VANGILDER, L. D. Ecology of a snake community in northeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 4, n. 2, p. 273-296, 1983.

VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles**. Academic Press, 2009.

VOLSØE, H. Structure and Seasonal Variation of the Male Reproductive Organs of "*Vipera Berus*"(L.). **Thesis of the Faculty of Mathematics and Natural History of the University of Copenhagen**.. B. Lunos Bogtrykkeri, 1944.

Capítulo I

A influência climática na reprodução das fêmeas de *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis*

RESUMO

O ciclo reprodutivo das fêmeas de *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis* foram comparados intra e interespecificamente, para análise dos períodos que ocorrem as fases reprodutiva e não-reprodutiva. Conforme a distribuição de cada espécie foi realizada uma comparação intraespecífica buscando averiguar modificações dos períodos do ciclo reprodutivo entre indivíduos localizados em duas zonas climaticamente diferentes, no caso zonas sul e litorânea para a espécie *M. corallinus* e zonas sudeste e centro para *M. frontalis*. O resultado da comparação mostrou que em *Micrurus corallinus*, as fêmeas da zona sul, região com temperaturas mais baixas no inverno, apresentaram modificações morfológicas (ao longo do oviduto) correspondentes à entrada na fase reprodutiva de uma forma branda ou com menor intensidade, quando comparadas com as fêmeas da zona litorânea região com maiores temperaturas no inverno. As análises histológicas indicam que o pico da fase reprodutiva nas fêmeas da zona sul ocorre na primavera seguido por uma queda no verão, ou seja, o investimento metabólico para a fase reprodutiva ocorre de maneira rápida e por um curto período, enquanto que as fêmeas da zona litorânea o pico da fase reprodutiva é alcançado no verão porém ela ocorre de uma forma mais gradual, do final do inverno até o início do outono, assim perdurando por um período maior. Provavelmente o frio do inverno interfira diretamente no metabolismo dos espécimes e conseqüentemente no início do período reprodutivo para as fêmeas da zona sul. Em contra partida, as fêmeas da zona litorânea tiveram um clima mais homogêneo, o que possibilitou uma ampliação dos períodos de cópula e da vitelogênese. A espécie *M. frontalis* mostrou maior concentração de folículos secundários no verão e no outono, a histologia mostrou o ápice reprodutivo na estação do outono. Este trabalho teve como resultado a primeira comprovação da estratégia de estocagem de espermatozoides nas fêmeas de ambas as espécies.

Palavras-chave: Reprodução, clima, estocagem, plasticidade e *Micrurus*.

INTRODUÇÃO

A variação da temperatura corporal nos animais ectotérmicos altera diretamente a sua condição ecofisiológica (ANGILLETTA JR et al., 2002; DE MESQUITA et al., 2011), nos Squamata há uma modificação em sua performance de crescimento, locomoção, forrageamento, digestão e reprodução (BROWN e SHINE, 2002a; MARQUES et al., 2006).

Desta forma, as diferentes variações no clima (e.g., temperatura máxima, mínima e índice pluviométrico) ao longo de um dia, em cada região, podem gerar novos padrões de ciclos reprodutivos (MATHIES, 2011). O ciclo reprodutivo nos ovíparos compreende a análise da vitelogênese, oviposição, eclosão dos filhotes nos ovos, espermatogênese e das estratégias de estocagem de esperma (BLACKBURN, 1998; PIZZATTO et al., 2007).

O tipo climático tropical úmido-seco está localizado na região central do país, abrangendo o domínio do Cerrado, que possui geralmente cinco meses secos e sete meses com maior pluviosidade, mesmo que nos períodos de estiagem o índice pluviométrico não chegue ao 0 mm, nos meses de junho e agosto algumas localidades como Distrito Federal aproximam-se desse valor (AB'SABER, 2003). No inverno, a umidade relativa atinge o nível de 38-40% muito semelhante à da Caatinga, enquanto que no verão chuvoso 95-97% de umidade (AB'SABER, 2003; MENDONÇA e DANNI-OLIVEIRA, 2007).

Dentro do tipo climático úmido-seco, temos o subtipo tropical central sem seca, onde se localiza parte do bioma Mata Atlântica (e.g., cidades como Caravelas (BA), Vitória (ES), Seropédica (RJ), Avaré (SP)), sendo que a faixa continental adjacente a região litorânea apresenta as chuvas bem distribuídas durante o ano e com uma amplitude térmica próxima de 8-10°C (Figura 3), devido principalmente pela influência da maritimidade e da altitude (MENDONÇA e DANNI-OLIVEIRA, 2007). No mesmo bioma mais ao sul do país, temos regiões como Porto Alegre e Curitiba, cuja temperatura no verão pode alcançar 36° C e no inverno 0°C, atestando uma considerável amplitude térmica (MENDONÇA e DANNI-OLIVEIRA, 2007).

O clima tropical não possui o frio do inverno intenso como das regiões temperadas, sendo marcado por duas estações, a das chuvas (primavera-verão), na qual se tem um aumento das temperaturas e a de seca ou estiagem (outono-inverno), com relativa queda de temperatura conforme a região (MARQUES et al., 2006; HARTMANN et al., 2009). Esses fatores refletem nos padrões de atividade de cada espécie, tais como, busca por presa, termorregulação, procura por parceiro na época reprodutiva (SAINT-GIRONS, 1982; MARQUES et al., 2001; ALMEIDA-SANTOS et al., 2006; LOVERN, 2011).

As diferentes estratégias de ciclo reprodutivo, ainda que dentro da mesma família ou gênero, podem estar relacionadas a linhagem filogenética de cada espécie (BROWN e SHINE, 2002b; DE MESQUITA et al., 2011; MARQUES et al., 2013), podendo haver uma modulação conforme as diferenças de hábitat onde a população se encontra, como observado na tribo Xenodontini (PIZZATO et al., 2008a, 2008b).

Dentro das estratégias reprodutivas, existem estruturas que são modificadas na época da reprodução, por exemplo, quando a cópula ocorre em um período muito afastado da época da ovulação, as fêmeas de algumas espécies possuem estruturas como receptáculos ou túbulos de estocagem no oviduto, que serviriam de abrigo para os espermatozoides até o folículo vitelogênico secundário ser liberado do ovário e adentrar o oviduto, ocorrendo assim a fertilização (GIRLING, 2002; SIEGEL et al., 2011).

Na literatura há a descrição de duas regiões onde os espermatozoides podem ser armazenados na fêmea, no infundíbulo posterior e em algumas espécies na região do oviduto posterior (também conhecida como junção útero-vagina), local onde em algumas espécies da família Viperidae, há a contração muscular uterina (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; SIEGEL et al., 2011; ROJAS et al., 2013).

A nomenclatura anatômica do trato reprodutivo das fêmeas, passa por algumas mudanças devido a fatores como diversidade de espécies dentro dos Squamata, a existência de espécies ovíparas e vivíparas, diferentes funções exercidas pelo oviduto e pelo aprofundamento das pesquisas morfofuncionais desta estrutura (BLACKBURN, 1998; GIRLING, 2002).

Girling (2002) em seu trabalho de revisão, utilizou a nomenclatura para subdivisão as regiões do oviduto: infundíbulo, tuba uterina, istmo, útero e vagina. Outra proposta mais recente de nomenclatura seria dividir o oviduto em infundíbulo anterior e posterior, útero glandular e aglandular e bolsa (SIEGEL et al., 2011), o termo bolsa foi designado para região caudal do oviduto.

Rojas et al., (2015) utilizou a nomeação infundíbulo, útero, junção útero-vagina (JUV) e cloaca, para as divisões do oviduto. Porém, o próprio autor afirma que algumas terminologias deveriam ser ou revistas, considerando a função e localização de determinadas porções do oviduto (ROJAS et al., 2015). Desta forma há a necessidade de maiores investigações da funcionalidade destas regiões e de análises comparativas com outras famílias, como exemplo a família Elapidae.

Micrurus corallinus é uma espécie com ampla distribuição dentro do bioma Mata Atlântica, tendo registros de sua presença do Rio Grande do Norte, Bahia até o Rio Grande do Sul (MARQUES, 1992; CAMPBELL e LAMAR, 2004; BASSI, 2013).

Micrurus frontalis possui a distribuição concentrada no bioma do Cerrado e ecótono Cerrado-Mata Atlântica (DA SILVA JR e SITES JR, 1999; CAMPBELL e LAMAR, 2004), (Figura 1).

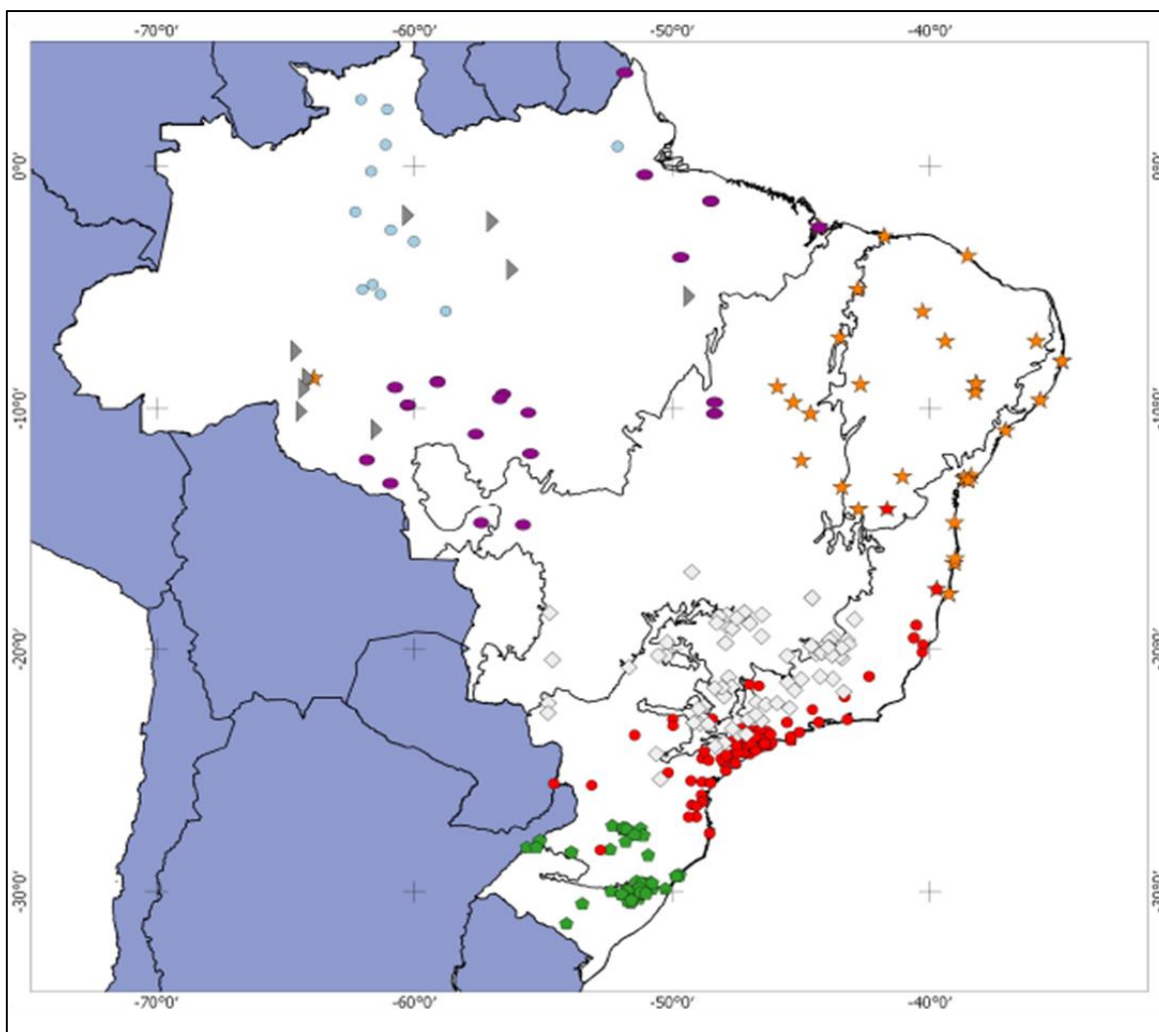


Figura 1. Mapa de biomas do Brasil com a distribuição de algumas espécies de coral verdadeira. *Micrurus corallinus* (vermelho); *Micrurus frontalis* (branco); *Micrurus altirostris* (verde); *Micrurus averyi* (azul); *Micrurus ibiboboca* (amarelo); *Micrurus hemprichii* (cinza); *Micrurus surinamensis* (roxo) (para elaboração do mapa de distribuição das espécies, foi gerado utilizando dados provenientes de coleções biológicas disponibilizados no sistema *specieslink*).

Essa heterogeneidade de climas e microclimas influenciaram na adaptação de padrões reprodutivos de muitas espécies, existindo assim uma sincronia entre o ciclo reprodutivo com as estações climáticas (LICHT, 1972; SAINT-GIRONS, 1982; TAYLOR e DENARDO, 2011). A modulação fisiológica ocasionada em animais ectotérmicos, devido a variações climáticas e disponibilidade de recursos, pode ser estudada utilizando-se animais que tenham uma distribuição territorial ampla (SANTOS et al., 2005). As serpentes servem como um bom modelo para se investigar a existência de uma plasticidade reprodutiva (SEIGEL e FORD; 2001; LOURDAIS, 2002; SANTOS et al., 2005).

No gênero *Micrurus* existem duas linhagens filogenéticas, conforme o padrão de coloração, anéis pretos em mônade (BRM) como apresentado por *M. corallinus* e anéis pretos em tríades (BRT), observado na *M. frontalis* (SLOWINSKI, 1995; CAMPBELL e LAMAR, 2004; MARQUES et al., 2013).

O ciclo vitelogênico de *M. frontalis* ocorre por um longo período no ano, sendo então estendido para a fêmea e no macho o pico da espermatogênese seria no verão muito próxima a época de cópula (MARQUES et al., 2013). Segundo Marques (1996) o ciclo da fêmea de *M. corallinus* seria sazonal, com o início da vitelogênese ocorrendo no início da época das chuvas (primavera) e a oviposição no início da estiagem.

O macho de *M. corallinus* teria o ciclo pós-nupcial do Tipo I, por análises morfométricas foi observado o pico do volume testicular no outono e um aumento na largura do ducto deferente na primavera, o que representaria um período de estocagem de espermatozoides no ducto deferente (ALMEIDA-SANTOS et al., 2006). Em *M. frontalis* foi relatado que a espermatogênese ocorreria entre o final da primavera e o início do verão e foi sugerido que a estocagem de espermatozoides ocorreria na fêmea, seguindo a estratégia reprodutiva das espécies BRT (MARQUES et al., 2013).

Almeida-Santos et al. (2006) descrevam, para *M. corallinus*, a existência de sincronismo dentro dos sexos e uma coordenação do ciclo reprodutivo do macho (pós-nupcial) e da fêmea (pré-nupcial); porém os próprios autores afirmam que os dados mais aprofundados do ciclo são necessários, devido à alta diversidade de padrões de ciclo dentro do grupo Elapidae, possivelmente por existir regiões climaticamente diferentes nos locais de distribuição deste grupo.

Em fêmeas adultas, pode-se utilizar como parâmetro a medição do maior folículo vitelogênico de cada espécime para se determinar em qual estágio do ciclo reprodutivo a fêmea se encontra (ALMEIDA-SANTOS 2005; PIZZATTO et al., 2007; MUNIZ-DA-SILVA, 2013).

Portanto, com este trabalho obteve-se dados sobre ciclo reprodutivo das fêmeas (duas espécies de corais verdadeiras), investigando as modificações existentes no ciclo devido a fatores climáticos e as estratégias reprodutivas adotadas por cada uma delas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 41 fêmeas de *Micrurus corallinus* e 20 de *Micrurus frontalis*, fixados em formol e álcool 70%, provenientes de coleções biológicas como: Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas (ZUEC), do Museu de História Natural Capão da Imbuía (MHNCI); Coleção Biológica do Instituto Butantan (IB), do Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ); do Museu de Ciências Naturais (MCNR) da Pontífice Universidade Católica de Minas Gerais; Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); Museu Biológico da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); e da Coleção Biológica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS).

A partir dos dados de data e local de coleta, conforme a distribuição de cada espécie, foi feita uma análise com as variáveis climáticas (e.g., temperatura máxima, mínima e índice pluviométrico) de cada região e assim uma delimitação de duas zonas climaticamente diferentes para (Figuras 2 e 3), sendo então utilizados somente os espécimes que foram coletados dentro destas zonas. O número amostral total, para cada espécie, inicialmente foi separado em duas populações (zonas climaticamente diferentes), estas por sua vez foram subdivididas conforme o sexo e a quatro estações do ano (Tabela 1).

Tabela 1. Número de espécimes mínimo para análise comparativa em cada zona, para cada espécie. O número amostral da histologia está contido no número de exemplares da biometria, ou seja, apenas de alguns indivíduos foram coletadas amostras teciduais para histologia.

Número de espécimes	Primavera	Verão	Outono	Inverno	Total
Biometria Fêmea	10	10	10	10	40
Histologia	5	5	5	5	20

DADOS AMBIENTAIS

Os dados climatológicos que foram utilizados para o enquadramento das cidades nas zonas sul/litorânea e centro/sudeste, vieram do banco de dados do

Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), dados mensais como índice pluviométrico total, temperatura máxima e temperatura mínima; de um período de 10 anos (1993-2013).

As zonas foram delimitadas conforme o enquadramento das cidades, onde o espécime foi coletado, com características climáticas semelhantes. Para as cidades onde os espécimes de *M. corallinus* foram coletados se enquadrarem na zona sul, estas deveriam apresentar: amplitude térmica maior que 10°C e a estação do inverno marcante com temperaturas médias iguais ou inferiores a 10°C (Figura 2); cidades da região litorânea não foram enquadradas nesta zona.

As cidades que foram enquadradas na zona Litorânea, possuíam as seguintes características de clima: Médias de temperaturas acima dos 12°C, baixa amplitude térmica; chuvas bem distribuídas ao longo do ano, ou seja, sem período de estiagem, com índice pluviométrico acima 70mm de chuva (Figura 2).

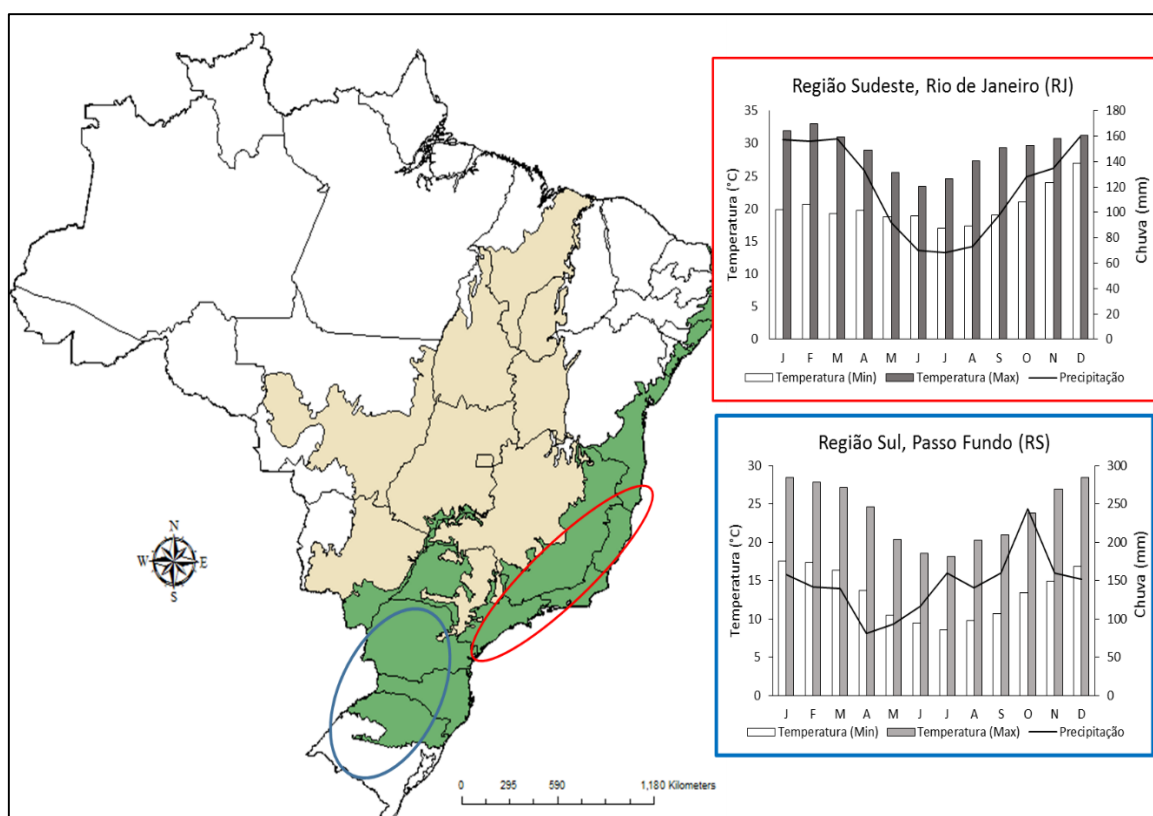


Figura 2. Mapa dos biomas Cerrado e Mata Atlântica, em detalhe duas zonas climaticamente diferentes enquadrando os espécimes de *Micrurus corallinus*. Zona sul (círculo em azul) e zona litorânea (círculo em vermelho). Climatogramas referentes as zonas litorânea e sul, dados provenientes do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) do período de 1993-2013.

Para *M. frontalis*, as cidades deveriam possuir as seguintes características climáticas: zona centro (azul) baixa amplitude térmica, inverno pouco marcante com temperaturas mínimas iguais ou superiores a 15°C e apresentar ao menos 3 meses de estiagem ao longo do ano, ou seja, índice pluviométrico abaixo de 50 mm de chuva (Figura 3).

Zona sudeste (vermelho) amplitude térmica acima de 15°C, inverno com temperaturas inferiores a 15°C, e índice pluviométrico acima de 50 mm ao longo do ano (Figura 3).

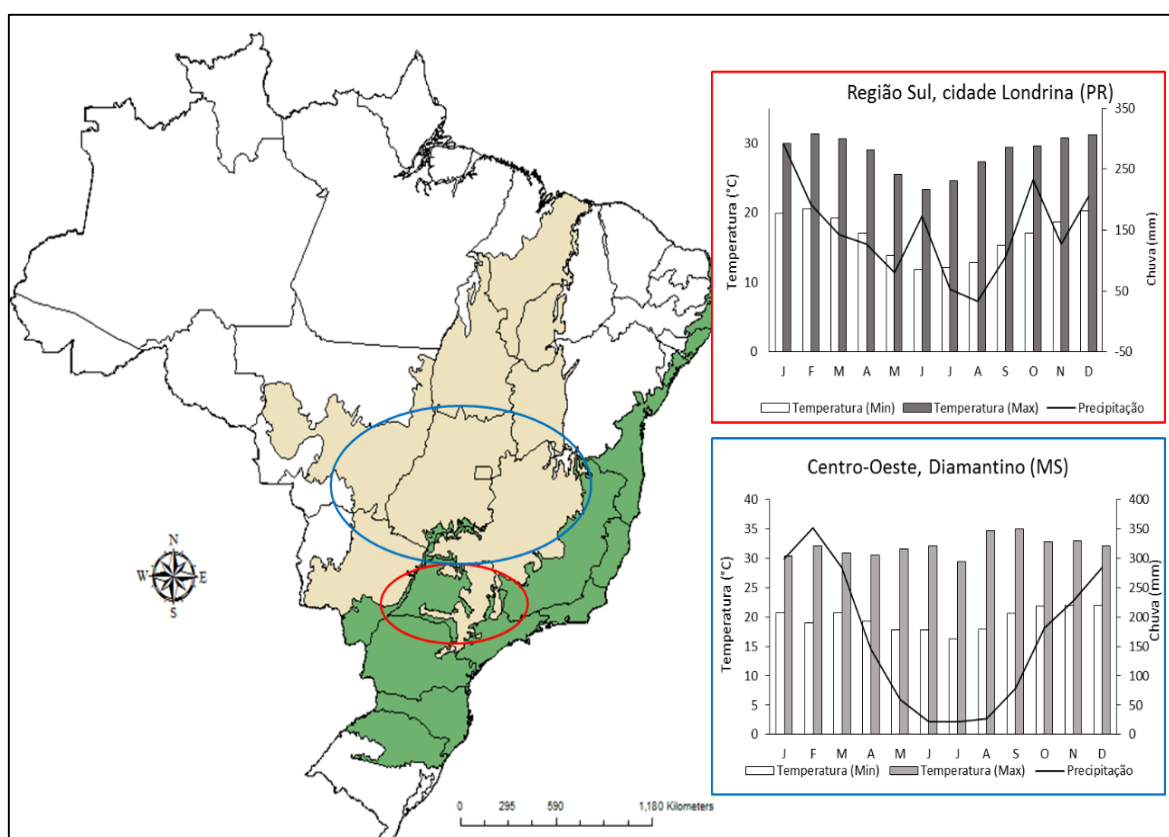


Figura 3. Mapa dos biomas Cerrado e Mata Atlântica, em detalhe duas zonas climaticamente diferentes enquadrando os espécimes de *Micrurus frontalis*. Zona centro (círculo em azul) e zona sudeste (círculo em vermelho). Climatogramas referentes as zonas centro e sudeste, dados provenientes do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) do período de 1993-2013.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente com a análise macroscópica foi feita a descrição das características morfológicas do sistema reprodutor feminino encontrado nas duas

espécies. Para morfometria, a medida do comprimento do maior folículo vitelogênico, serviu para definir os períodos da vitelogênese primária e secundária (cf., ALMEIDA-SANTOS et al., 2006; BARROS et al., 2012).

A histologia nas porções do oviduto das fêmeas permitiu a análise do estágio no qual o espécime se encontrava, reprodutiva e não reprodutiva, possibilitando assim a comparação entre as estações. Verificando-se há existência de diferenças morfológicas relacionadas ao início do período reprodutivo entre as populações das duas zonas (Figuras 2 e 3). Além da verificação da ocorrência de receptáculos ou túbulos de estocagem de espermatozoides no oviduto da fêmea.

MORFOMETRIA E DISSECÇÃO DOS ESPÉCIMES

Para todos os espécimes foram anotados os seguintes dados: Comprimento rostro-cloacal (Crc). A medida da circunferência da região mediana do corpo e o valor de massa corpórea.

A dissecção dos espécimes foi realizada com uma incisão longitudinal ventral a partir da cloaca até um terço do comprimento total, os seguintes dados foram coletados: presença de ovos no oviduto; número e estágio de desenvolvimento dos folículos vitelogênicos; comprimento do maior folículo (mm), com paquímetro digital.

Os dados de comprimento dos maiores folículos (mm), foram plotados em um gráfico de dispersão, possibilitando a análise do ciclo vitelogênico e consequentemente o ciclo reprodutivo.

COLETA DE TECIDO E HISTOLOGIA

Os exemplares de cada espécie tiveram algumas regiões do sistema reprodutor coletadas para histologia, cada fragmento tecidual media aproximadamente 2 cm cada, os locais coletados foram: infundíbulo posterior, oviduto anterior e oviduto posterior, apenas do lado direito (Figura 4 e 5). As amostras coletadas foram imersas em álcool a 70% e armazenadas em cassetes histológicos para preservação até o preparo histológico.

O material passou por um processo de desidratação em série alcoólica crescente, por uma hora cada. Após a desidratação, os tecidos foram diafanizados em xilol por uma hora e incluídos em parafina. Os cortes realizados foram feitos com a espessura de 5 micrômetros, a coloração básica utilizada para análise foi a de hematoxilina e eosina (H/E), de acordo com o protocolo utilizado no laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LABIOCEL) e disponibilizado na internet (LABIOCEL, 2002). Outras colorações também foram utilizadas para análise morfológica do oviduto, como o Tricrômico de Gômori e Tricrômico de Touchman (cf., Junqueira e Junqueira, 1983). Ambas as colorações deixam as camadas teciduais com colorações diferentes, promovendo assim uma maior delimitação entre estas. Além de evidenciar a região epitelial, as glândulas no tecido conjuntivo ficaram realçadas.

HISTOQUÍMICA

Após a realização dos cortes algumas lâminas foram selecionadas para a análise histoquímica, as colorações utilizadas foram o Azul de Bromofenol (BB) para observar reações histoquímicas de natureza proteica, Alcian Blue (AB) para mucopolissacarídeos ácidos e Ácido Periódico–*Schiff* (PAS) na determinação de mucopolissacarídeos neutros. A contra coloração utilizada foi a hematoxilina. Os protocolos utilizados seguiram como bases Junqueira e Junqueira (1983), entretanto estes foram adaptados em relação a duração em cada corante.

FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise dos resultados foi comparativa, baseada nas lâminas histológicas, primeiramente entre as estações e posteriormente entre as zonas climaticamente diferentes.

A comparação foi possível quando alcançado o número amostral mínimo de cinco indivíduos por estação e só foram considerados os espécimes que não apresentavam as características de degradação tecidual. Após a confecção das

lâminas histológicas, a análise foi baseada nas seguintes características morfológicas:

- Arquitetura do epitélio: simples ou estratificado; cuboide ou colunar; com ou sem a presença de cílios.
- Espessura das camadas do tecido conjuntivo (TC) e tecido muscular (TM).
- Tecido conjuntivo: Presença ou ausência de glândulas
- Glândulas: Com ou sem hipertrofia (apresentando grânulos em seu interior).
- Lúmen (luz do oviduto): Presença ou ausência de muco

A partir das características expostas foi considerado ápice da fase reprodutiva: Epitélio colunar ciliado, tecidos conjuntivo e muscular espessos (oviduto anterior e posterior); grande quantidade de glândulas hipertrofiadas e grande quantidade de muco secretado no lúmen.

As características que indicavam maior proximidade com a fase não-reprodutiva: epitélio cuboide, ausência de cílios, tecidos conjuntivo e muscular delgados; baixa quantidade ou ausência de glândulas hipertrofiadas; ausência ou baixa quantidade de secreção do lúmen.

Considera-se ápice da fase reprodutiva as modificações de preparo para captação dos folículos ovulados.

Após a análise comparativa da histologia, entre os espécimes das duas zonas, um resumo qualitativo foi realizado atribuindo valores usando a quantidade de símbolos de (+), sendo o valor mínimo de um e máximo de cinco.

A análise feita foi em relação a algumas características morfológicas seguindo o seguinte critério:

- ✓ Arquitetura do epitélio simples cuboide (+), colunar baixo pontualmente ciliado (+++) e todo epitélio colunar ciliado com núcleo bem evidente (+++++).
- ✓ Estado e quantidade das glândulas exócrinas presentes no tecido conjuntivo, ausente ou poucas (+), algumas hipertrofiadas e hipotrofiadas (+++) e muitas hipertrofiadas (+++++).
- ✓ Quantidade de muco no lúmen ovidutal, ausente ou regiões pontuais (+), muitas regiões com muco (+++) e em quase toda a extensão (+++++);
- ✓ Quantidade de receptáculos ciliados, ausente ou poucos (+), regiões pontuais e estes com grânulos (+++) e grande quantidade com grânulos (+++++).

RESULTADOS

SISTEMA REPRODUTOR FEMININO.

O sistema reprodutor das fêmeas é bilateral com o lado direito mais alongado e cranial que o esquerdo, em ambas as espécies. Cada lado é formado por um ovário e por um oviduto (Figura 4) que em sua porção terminal se conecta à cloaca. O oviduto pode ser subdividido em infundíbulo anterior, infundíbulo posterior, oviduto anterior, oviduto posterior e vagina ou bolsa (Figura 5).

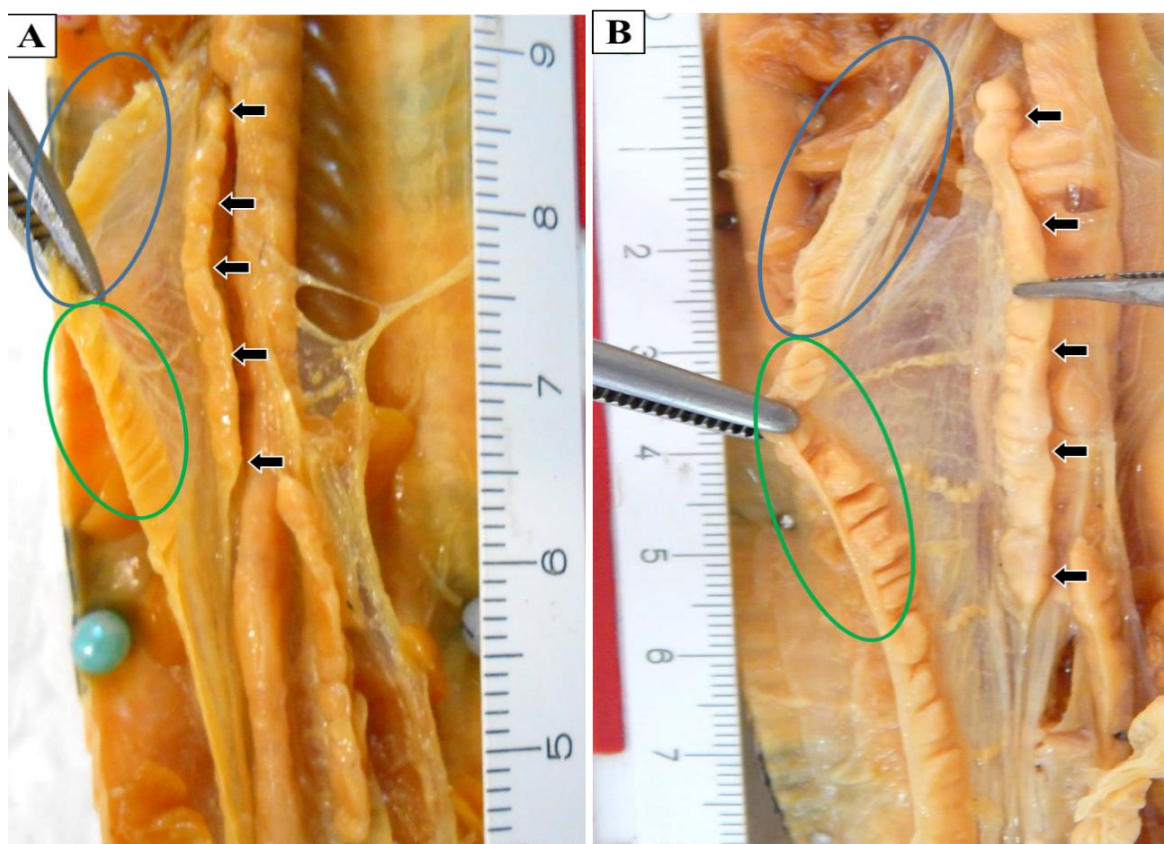


Figura 4. Região infundibular, fêmeas de *Micrurus corallinus*. **(A)** espécime juvenil. **(B)** espécime adulto. Círculo azul indicando infundíbulo anterior. Círculo verde infundíbulo posterior. Seta preta indicando a extensão do ovário.

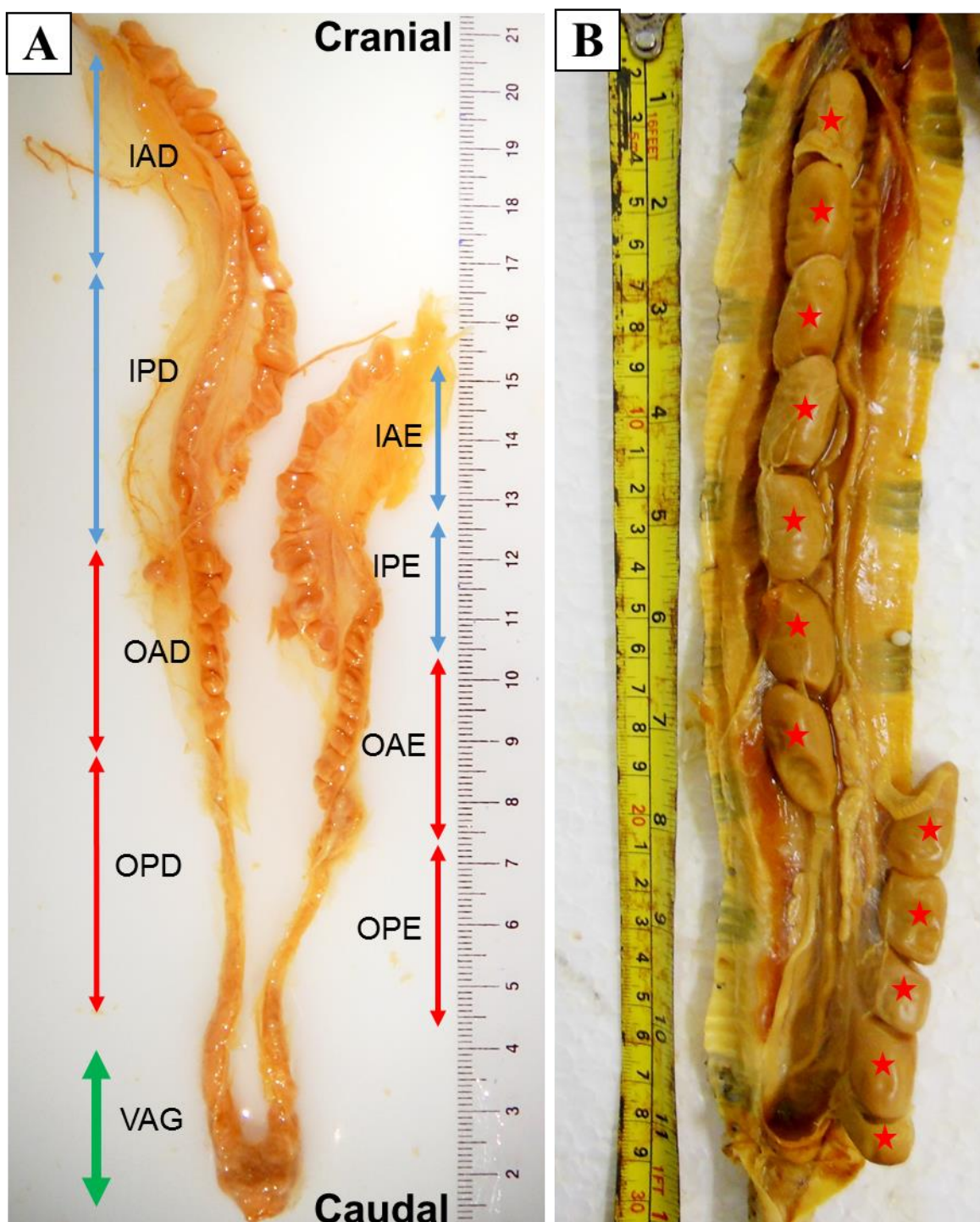


Figura 5. Sistema reprodutor da fêmea. **(A)** *Micrurus frontalis*, subdivisões do oviduto, as setas indicam a delimitação de cada região, azul infundíbulo: anterior direito (IAD) e esquerdo (IAE); posterior direito (IPD) e esquerdo (IPE); em vermelho o oviduto: anterior direito (OAD) e esquerdo (OAE), posterior direito (OPD) e esquerdo (OPE); e em verde a vagina ou bolsa (VAG). **(B)** *Micrurus corallinus*, oviduto direito e esquerdo com ovos, indicados pelas estrelas em vermelho.

ANÁLISES DOS FOLÍCULOS OVARIANOS.

Os dados foliculares das fêmeas de *M. corallinus* das zonas sul e litorânea foram somados para se obter uma resposta mais conclusiva (Figura 6). No total foram analisados 44 espécimes adultos, podemos observar que foram encontrados ovos na estação da primavera e do verão. Os folículos vitelogênicos secundários (maiores que 15 mm), em sua maioria estavam presentes no período chuvoso entre outubro e março; entretanto uma das fêmeas (zona litorânea) exibiu um crescimento folicular fora deste padrão, no final do outono.

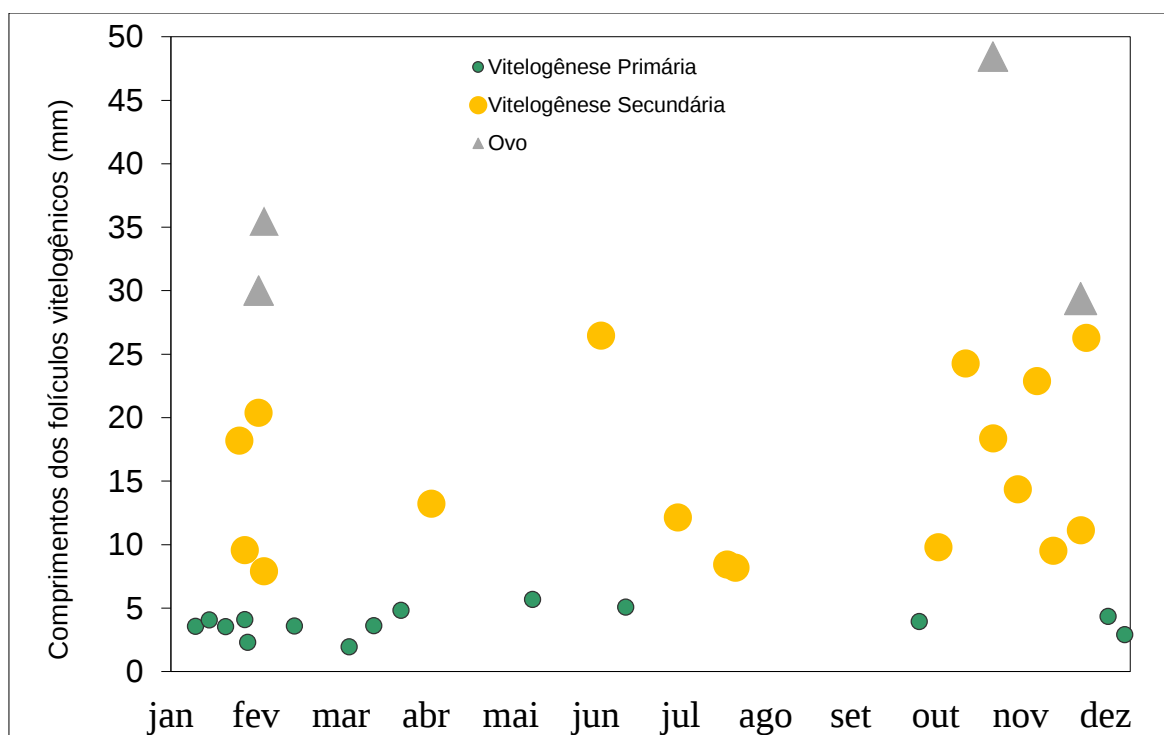


Figura 6. Gráfico de dispersão dos folículos vitelogênicos, referente aos exemplares das fêmeas de *Micrurus corallinus*. Em verde, folículos primários (comprimento até 5 mm), em amarelo os folículos secundários e em cinza ovos no oviduto.

Na análise do gráfico folicular foram analisadas 20 fêmeas de *M. frontalis*, a presença de ovo no oviduto apenas foi constatada em um exemplar coletada na estação do verão. Os folículos vitelogênicos secundários, maiores que 15 mm, foram observados entre o final da primavera e até o outono (Figura 7).

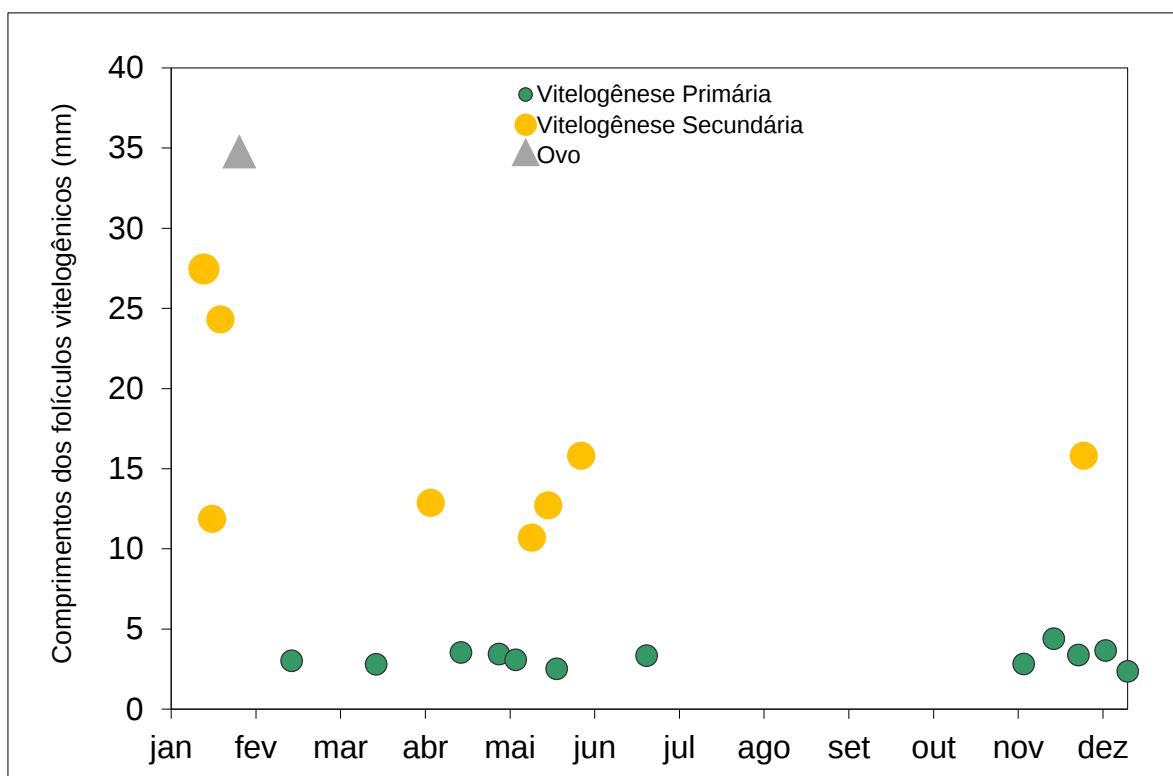


Figura 7. Gráfico de dispersão dos folículos vitelogênicos, referente aos exemplares das fêmeas de *Micrurus frontalis*. Em verde, folículos primários (comprimento até 5 mm), em amarelo os folículos secundários e em cinza ovos no oviduto.

ANÁLISE HISTOLÓGICA DO OVIDUTO DAS FÊMEAS DE *MICRURUS FRONTALIS*

O número amostral mínimo para comparação entre as zonas sudeste e centro não foi atingido, desta forma os dados das zonas centro e sudeste foram somados e a análise foi somente entre as estações primavera, verão e outono. Mesmo com a soma, o número mínimo de exemplares coletados no inverno não foi atingido.

Estação Primavera

Nesta estação foi possível observar que alguns espécimes de *Micrurus frontalis* apresentaram características de entrada do período reprodutivo, porém isso não foi evidenciado em todos os indivíduos. Pode ser que esta estação seja

apenas uma ampliação ou antecipação da época reprodutiva (preparo do oviduto para captação do folículo ovulado) por alguns indivíduos.

A arquitetura do infundíbulo posterior exibiu o epitélio simples cúbico, o tecido conjuntivo mostrou a ausência ou baixa quantidade de glândulas, estando estas hipotrofiadas. A luz infundibular exibiu algumas regiões com muco (Figura 8A). As mesmas características foram observadas no oviduto anterior, apenas em alguns espécimes o epitélio mostrou-se colunar e com uma quantidade um pouco maior de muco (Figura 8B).

O oviduto posterior exibiu um epitélio simples colunar, em algumas porções este mostrou-se secretivo. No tecido conjuntivo havia uma grande quantidade de receptáculos com grânulos, alguns espécimes apresentaram espermatozoides em túbulos e receptáculos de estocagem (Figura 8C, D).

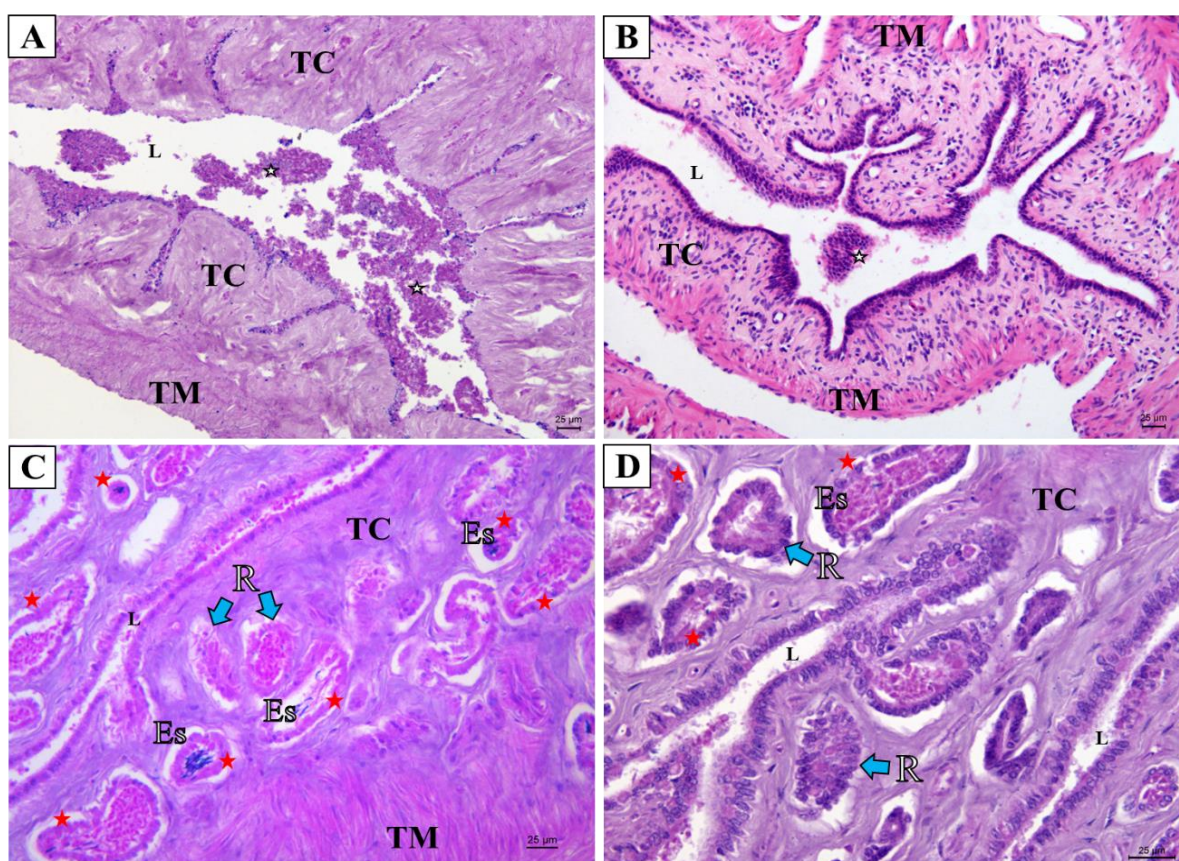


Figura 8. Cortes histológicos longitudinais do trato reprodutor das fêmeas de *Micrurus frontalis*, estação da primavera. Coloração H/E. **(A)** infundíbulo posterior mostrando uma grande concentração de muco no lúmen infundibular. Objetiva de 20x. Escala 25 µm. **(B)** oviduto anterior exibindo um epitélio simples cúbico e muco na luz do oviduto. Objetiva de 20x. Escala 25 µm. **(C e D)** Oviduto posterior evidenciando o epitélio simples colunar; o tecido conjuntivo com receptáculos com grânulos em seu interior, indicado pelas setas em azul; receptáculos de estocagem de espermatozoides, indicados pelas estrelas vermelhas. Objetiva de 20 e 40x. Escala 25 µm. **(Es)** espermatozoides.

(Estrela branca) indicando a presença o muco no lúmen. **(R)** receptáculo. **(TM)** Tecido muscular. **(TC)** tecido conjuntivo.

Estação Verão

Os espécimes desta estação não apresentaram diferenças significativas na região do infundíbulo, sendo as características encontradas semelhantes às da primavera. No oviduto anterior todos os exemplares exibiram o epitélio simples colunar, como diferença da estação anterior, foram observadas regiões específicas com os cílios hipertrofiados e no tecido conjuntivo há receptáculos ciliados vazios (Figura 9C). Nesta estação, o oviduto posterior mostrou maior concentração de muco no lúmen ovidutal, no tecido conjuntivo há uma grande quantidade de receptáculos de estocagem (Figura 9D).

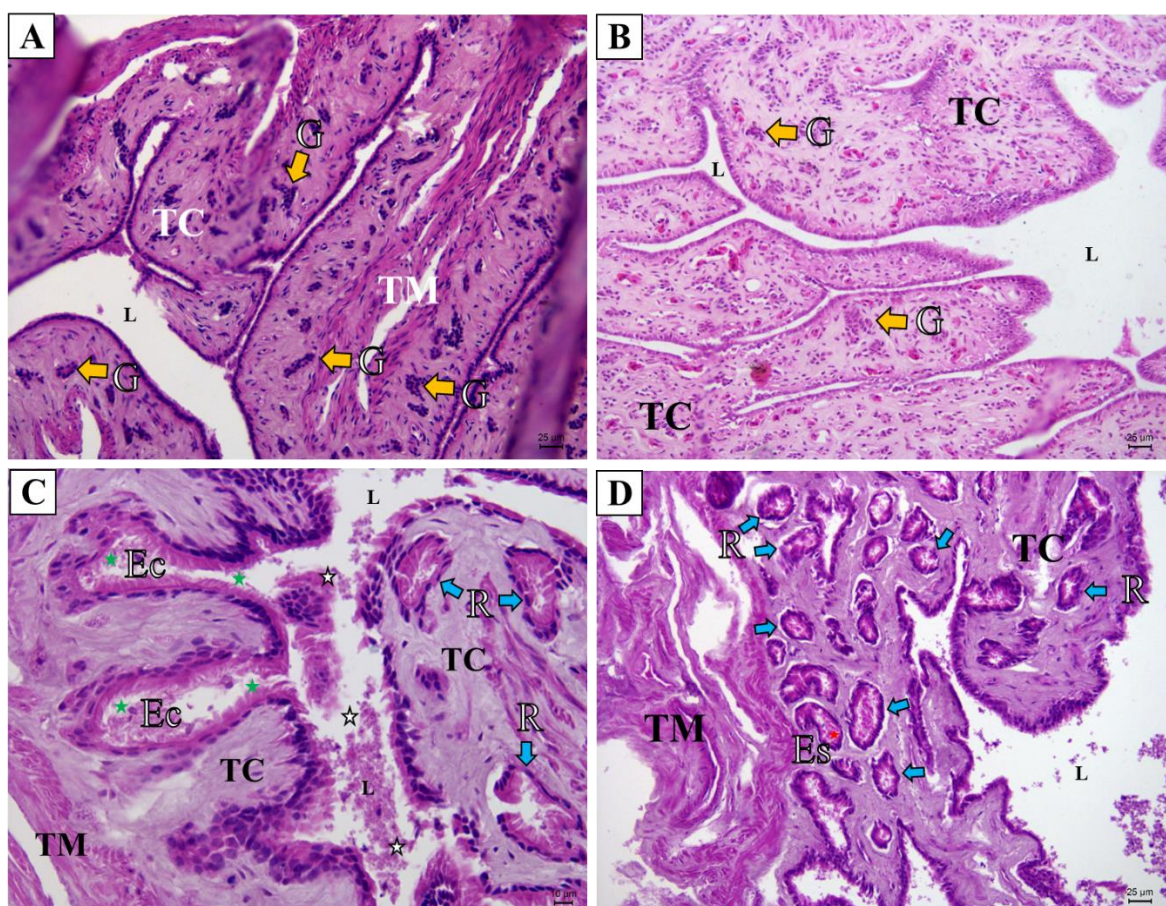


Figura 9. Cortes histológicos longitudinais do trato reprodutor das fêmeas de *Micrurus frontalis*, estação do verão. Coloração H/E. **(A)** infundíbulo posterior apresentando algumas glândulas hipotrofiadas no tecido conjuntivo, indicados pela seta amarela. **(B e C)** oviduto anterior, na primeira imagem há a presença de glândulas hipotrofiadas, indicados pela seta amarela e na segunda imagem observa-se regiões com uma hipertrofia dos cílios presentes no epitélio ovidutal, indicados pelas estrelas em verde; e receptáculos ciliados

vazios, evidenciados pela seta azul. **(D)** oviduto posterior. **(Ec)** epitélio ciliado. **(Es)** espermatozoides. **(Estrela branca)** indicando a presença o muco no lúmen. **(G)** glândula. **(R)** receptáculo. **(TM)** Tecido muscular. **(TC)** tecido conjuntivo.

Estação Outono

No período de abril a junho (outono) as fêmeas de *Micrurus frontalis*, apresentam a morfologia do sistema reprodutor quase totalmente apto ou em condições de receber os folículos pré ovulatórios no oviduto. O infundíbulo exibe muitos locais com os cílios epiteliais bem desenvolvidos e com a presença de algumas glândulas hipertrofiadas. O oviduto anterior possui uma concentração bem maior de glândulas hipertrofiadas, porém a quantidade de muco secretado era pequena. O oviduto posterior quase em sua totalidade exibia o epitélio colunar ciliado e receptáculos de estocagem foram encontrados nesta região (Figura 10).

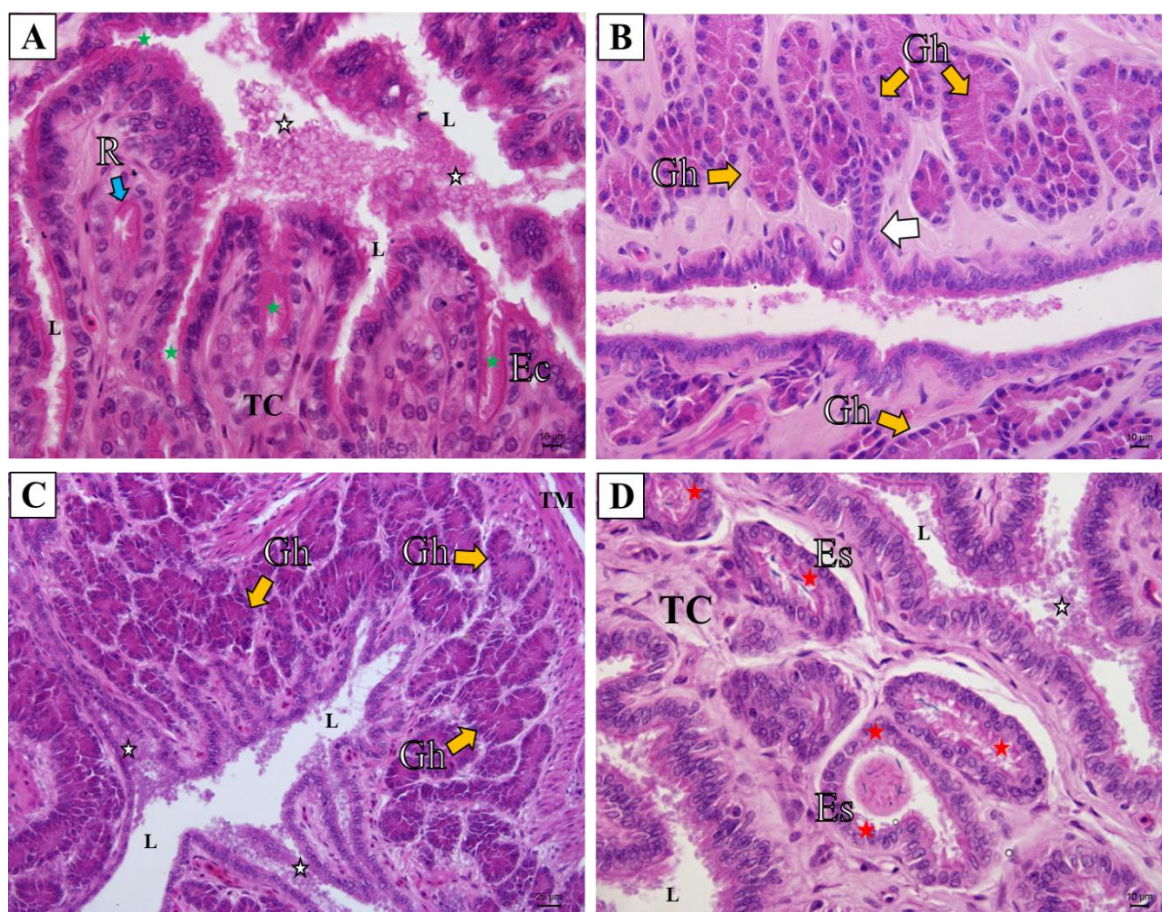


Figura 10. Cortes histológicos longitudinais do trato reprodutor das fêmeas de *Micrurus frontalis*, estação do outono. Coloração H/E. **(A)** infundíbulo posterior mostrando regiões do epitélio com os cílios bem desenvolvidos, indicado pela estrela verde; glândulas hipertrofiadas (seta amarela); e a presença de muco no lúmen infundibular. Objetiva de 40x. escala 10 µm. **(B e C)** oviduto anterior exibindo o tecido conjuntivo com grande

concentração de glândulas hipertrofiadas, indicado pela seta amarela; seta branca evidenciando o ducto glandular mostrando a liberação do material secretado. Objetiva de 20 e 40x. Escala 25 e 10 μm . **(D)** oviduto posterior apresentando receptáculos de estocagem com grânulos e outros com espermatozoides, indicado pela estrela vermelha. Objetiva de 40x. escala 10 μm . **(Es)** espermatozoides. **(Estrela branca)** indicando a presença o muco no lúmen. **(Gh)** glândula hipertrofiada. **(R)** receptáculo. **(TM)** Tecido muscular. **(TC)** tecido conjuntivo.

ANÁLISE HISTOLÓGICA DO OVIDUTO DAS FÊMEAS DE *MICRURUS CORALLINUS*

É possível distinguir dois períodos, caracterizados por sucessivas modificações formando assim um ciclo. A primeira fase (ou estágio) seria o não reprodutivo, pela macroscopia observa-se que o ovário apresenta folículos somente em vitelogênese primária, o infundíbulo mostra-se espesso e o oviduto anterior apresenta dobras formando uma espécie de sanfona.

Pela análise histológica a arquitetura tecidual mostra uma camada muscular espessa do infundíbulo posterior. O oviduto como um todo exibe regiões com o epitélio simples cuboide com um número reduzido de glândulas e pouco muco no lúmen do oviduto. As características morfológicas encontradas mudam gradativamente conforme o período do ciclo, para a segunda fase.

A segunda fase (ou estágio) seria o reprodutivo ou secretivo, no qual a análise macroscópica mostra o ovário apresentando folículos em vitelogênese secundária; o infundíbulo anterior, próximo ao óstio infundibular, exibe um tecido extremamente delgado e delicado, no qual envolve o ovário em sua região mais cranial; o oviduto anterior mostra um aumento no diâmetro, provavelmente para alocação dos ovos ou folículos ovulados.

COMPARAÇÃO DAS ZONAS CLIMATICAMENTE DIFERENTES: ZONA SUL

Estação Primavera

Os exemplares apresentaram o infundíbulo posterior com uma camada muscular delgada, o tecido conjuntivo continha poucas glândulas de secreção hipertrofiadas. No geral, os espécimes mostraram uma concentração glandular maior no oviduto anterior, juntamente com uma quantidade maior de muco no lúmen. O oviduto posterior apresentou quase em sua totalidade um epitélio colunar simples ciliado, com a presença de receptáculos (também ciliados) que internamente exibiam um conteúdo denso e granular (Figura 11).

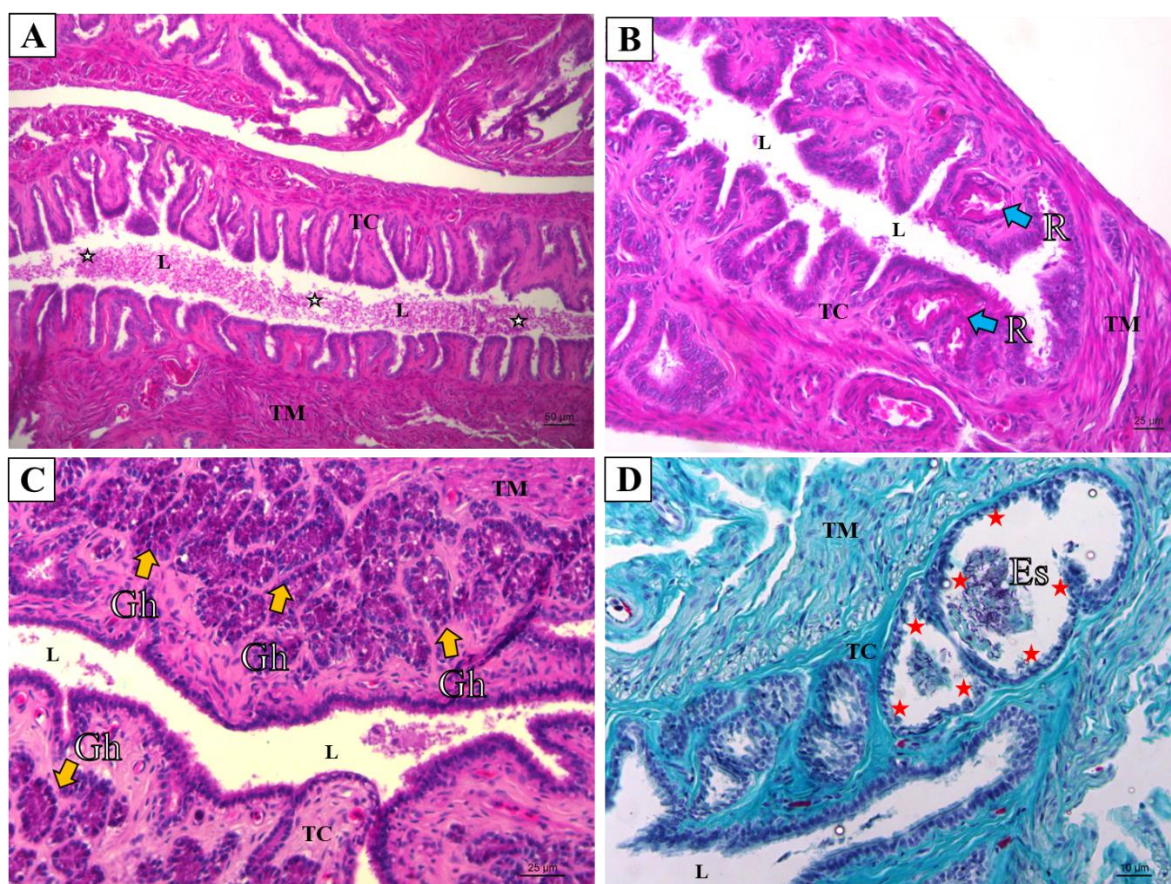


Figura 11. Cortes histológicos longitudinais do trato reprodutor das fêmeas de *Micrurus corallinus*, coletados na zona sul, estação da primavera. **(A)** infundíbulo posterior com secreção presente no lúmen, indicados pelas estrelas de cor branca. Objetiva de 10x. escala 50 µm. H/E. **(B)** no infundíbulo posterior receptáculos ciliados, indicados pelas setas de cor azul. Objetiva de 20x. escala 25 µm. H/E. **(C)** oviduto anterior, setas em amarelo indicando as glândulas. Objetiva de 20x. escala 25 µm. H/E. **(D)** receptáculo de espermatozoide encontrado no oviduto posterior, delimitado pelas estralas em vermelho. Objetiva de 20x. escala 25 µm. Coloração

Tricrômero de Gomori. **(Ec)** Epitélio ciliado. **(Es)** espermatozoides. **(Gh)** glândula hipertrofiada. **(R)** receptáculo. **(TM)** Tecido muscular. **(TC)** tecido conjuntivo. **(L)** Luz do oviduto.

Estação Verão

Não foram observadas modificações significativas, nas três regiões do oviduto (infundíbulo posterior, oviduto anterior e posterior) em relação a quantidade de glândulas, espessura das camadas conjuntiva e muscular. Em comparação com a estação anterior, o oviduto posterior mostrou regiões específicas em que os cílios do epitélio estavam com um maior desenvolvimento (Figura 12C, D). Ao mesmo tempo, também foram constatados receptáculos de estocagem nesta estação, alguns com espermatozoides e outros contendo um material denso e granular em seu interior; porém a quantidade observada foi menor.

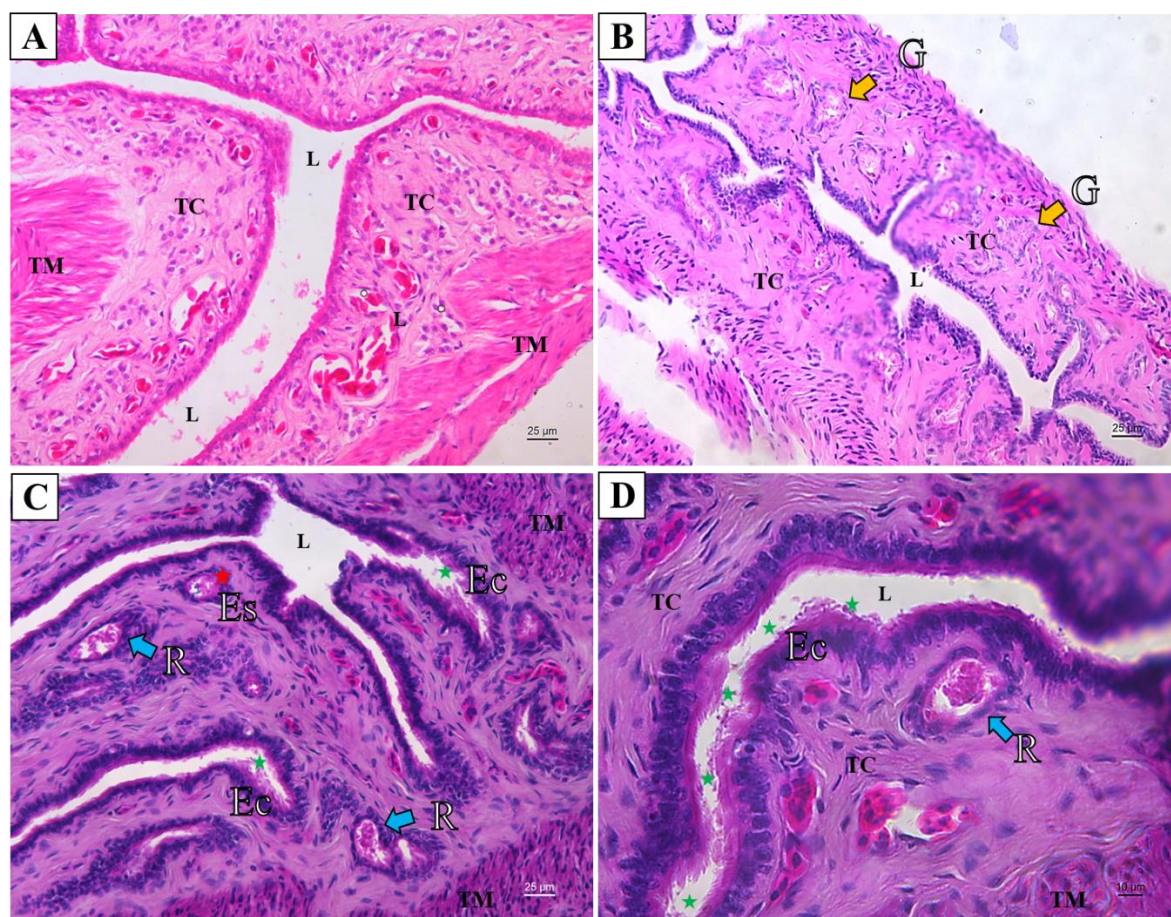


Figura 12. Cortes histológicos longitudinais do trato reprodutor das fêmeas de *Micrurus corallinus*, coletados na zona sul, estação do verão. H/E **(A e B)** infundíbulo posterior com epitélio cuboide e pouca secreção no lúmen. Objetiva de 20x. escala 25 µm. **(C e D)** regiões do oviduto posterior com epitélio desenvolvido e receptáculos. Objetiva de 20x e 40x. escalas 50 e 25 µm. **(Ec)** Epitélio ciliado.

(Es) espermatozoides. (G) glândula. (R) receptáculo. (TM) Tecido muscular. (TC) Tecido conjuntivo. (L) Luz do oviduto. (Seta azul) receptáculos com cílios e conteúdo condensado ou granular. (Seta amarela) glândula ovidutal. (Estrela verde) epitélio com cílios desenvolvidos. (Estrela vermelha) receptáculo de estocagem.

Estação Outono

Os espécimes desta estação exibiram um pequeno aumento do número de glândulas, no infundíbulo posterior e no oviduto anterior, porém estas não estavam hipertrofiadas; há um pequeno aumento de secreção no lúmen. O oviduto posterior, por outro lado, apresentou uma quantidade maior de secreção na luz, em quase toda a sua extensão; aparentemente o epitélio exibia a conformação pseudo-estratificado e os cílios estavam pouco evidentes (Figura 13).

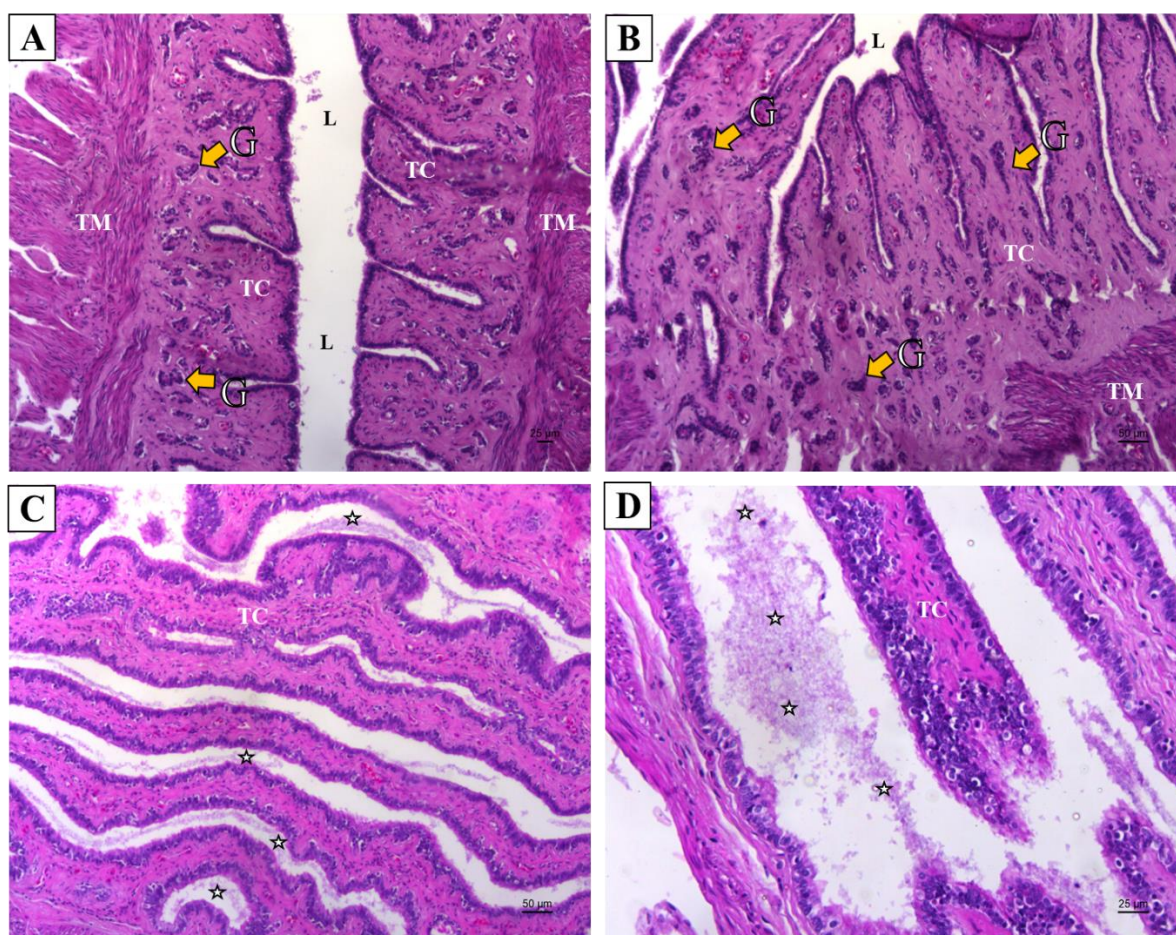


Figura 13. Cortes histológicos longitudinais do trato reprodutor das fêmeas de *Micrurus corallinus*, coletados na zona sul, estação do outono. H/E (A) infundíbulo posterior exibindo glândulas não hipertrofiadas. Objetiva de 10x. escala 25 µm. (B) oviduto anterior com um espessamento do tecido conjuntivo. Objetiva de 10x. escala 50 µm. (C) oviduto posterior mostrando secreção no lúmen em quase toda a sua extensão. Objetiva de 10x. Escala 50 µm. (D) em detalhe muco presente na

luz do oviduto posterior e o epitélio pseudo-estratificado. Objetiva de 20x. Escalas 25 µm. **(Gh)** glândula hipertrofiada. **(TM)** Tecido muscular. **(TC)** Tecido conjuntivo. **(L)** Luz do oviduto. **(Seta amarela)** glândula ovidutal. **(Estrela branca)** muco na luz do oviduto.

Estação Inverno

Nesta estação, os espécimes apresentaram um espessamento do tecido conjuntivo no infundíbulo. E foi observado, tanto no infundíbulo quanto no oviduto posterior, um número expressivo de receptáculos contendo internamente material denso e granular; o epitélio apresentou regiões com cílios desenvolvidos nos locais de maior concentração destes receptáculos. De um modo geral, as três regiões do oviduto apresentaram pouca quantidade de muco no lúmen (Figura 14).

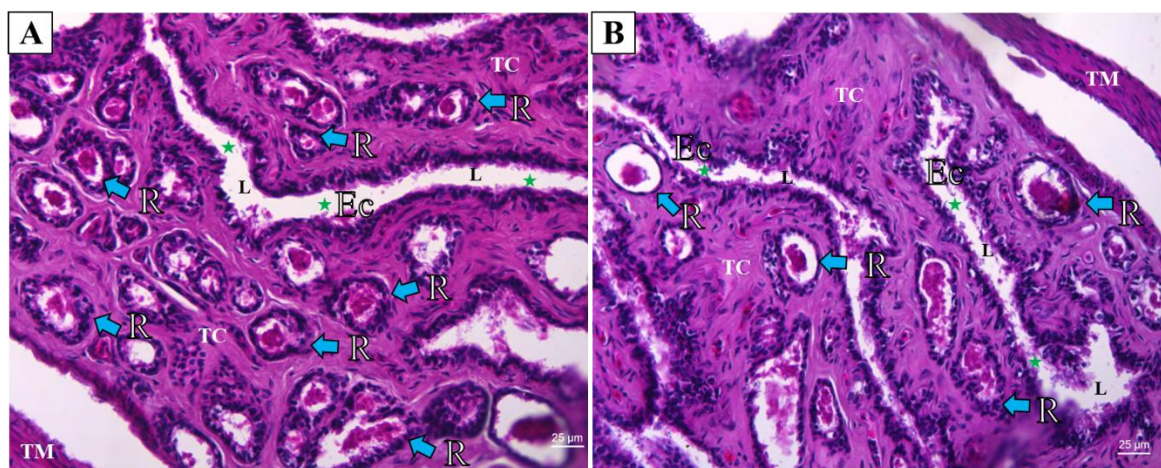


Figura 14. Cortes histológicos longitudinais do trato reprodutor das fêmeas de *Micrurus corallinus*, coletados na zona sul, estação do inverno. Objetiva de 20x. escala 25 µm. coloração H/E. **(A)** infundíbulo posterior exibindo um grande número de receptáculos no tecido conjuntivo. **(B)** oviduto posterior mostrando também receptáculos no tecido conjuntivo. **(Ec)** Epitélio ciliado **(R)** receptáculo. **(TM)** Tecido muscular. **(TC)** Tecido conjuntivo. **(L)** Luz do oviduto. **(Seta azul)** receptáculos com cílios e conteúdo condensado ou granular. **(Estrela verde)** epitélio com cílios desenvolvidos.

ZONA LITORÂNEA

Estação Primavera

Os espécimes examinados no início da estação mostram a região do infundíbulo posterior com a camada do tecido muscular delgada; tecido conjuntivo também delgado e um número reduzido ou ausência de glândulas de secreção;

lúmen quase sem muco e grande parte do oviduto apresentando um epitélio simples cúbico (Figura 15A). Essa conformação se estende por parte da região do oviduto anterior, no qual há um espessamento do tecido conjuntivo e uma maior quantidade de glândulas; no oviduto posterior as glândulas de secreção existentes estão hipertrofiadas e a luz do oviduto exhibe regiões com muco.

Espécimes que foram coletados no final da primavera, apresentaram algumas modificações como o epitélio colunar por quase todo oviduto, um aumento expressivo do número de glândulas no oviduto anterior, regiões do epitélio com cílios principalmente no oviduto posterior e uma maior quantidade de muco na luz do oviduto (Figura 15B, C e D).

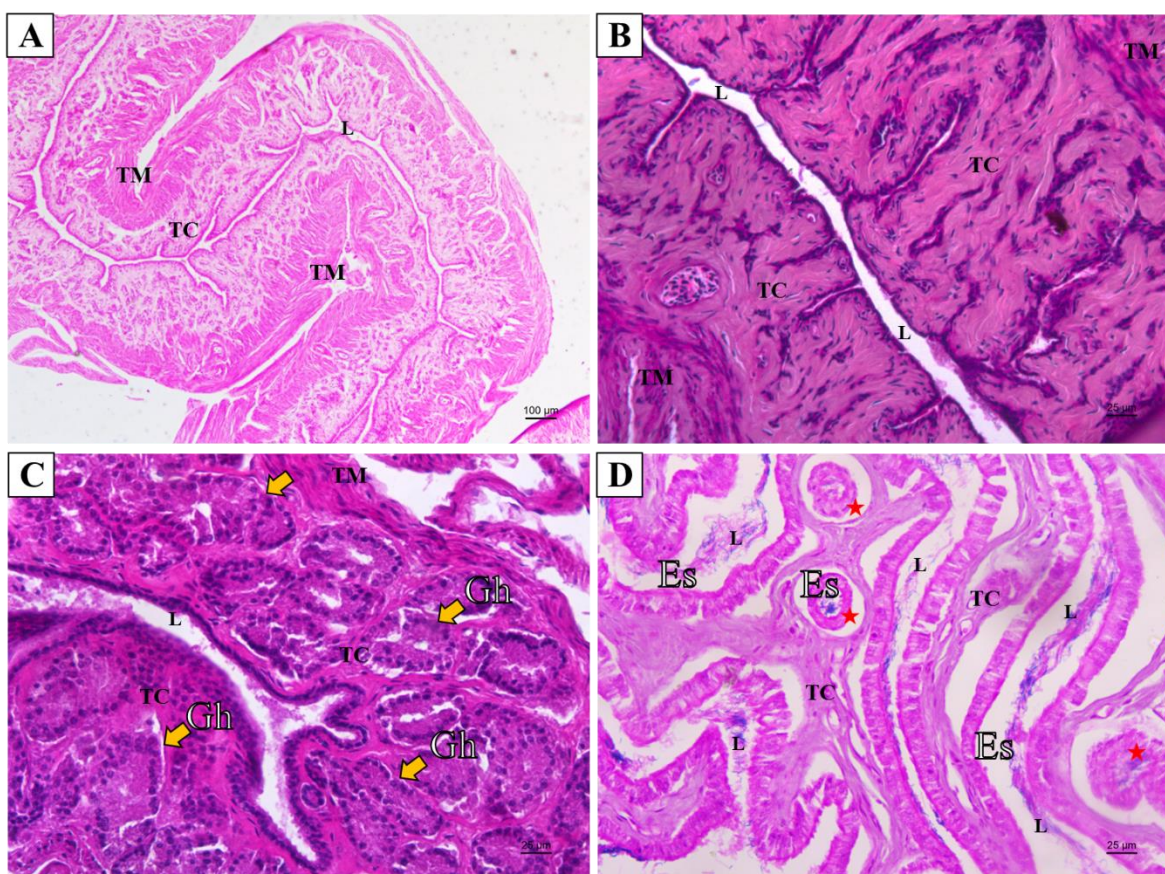


Figura 15. Cortes histológicos longitudinais do trato reprodutor das fêmeas de *Micrurus corallinus*, coletados na zona litorânea, estação da primavera. H/E (A) infundíbulo posterior de um espécime coletado no início da estação, tecidos conjuntivo e muscular delgados. Objetiva de 5x. escala 100 µm. (B) oviduto anterior mostrando um espessamento dos tecidos conjuntivo e muscular. Objetiva de 20x. Escala 25 µm. (C) oviduto anterior exibindo glândulas hipertrofiadas. Objetiva de 20x. Escala 25 µm. (D) Oviduto posterior abrigando espermatozoides na luz do oviduto e em receptáculos de estocagem. Objetiva de 20x. Escala 25 µm. (Es) espermatozoides. (Gh) glândula hipertrofiada. (R) receptáculo. (TM) Tecido muscular. (TC) Tecido conjuntivo. (L) Luz do oviduto. (Seta amarela) glândula ovidutal. (Estrela vermelha) receptáculo de estocagem.

Estação Verão

Nesta estação o infundíbulo posterior e oviduto anterior mostram um espessamento do tecido conjuntivo assim como da camada muscular, no qual foram observados feixes longitudinais e transversais (ou circulares); estas duas áreas, exibem o epitélio simples colunar ciliado, uma grande quantidade de glândulas hipertrofiadas e um aumento de secreção na luz do oviduto. (Figura 16).

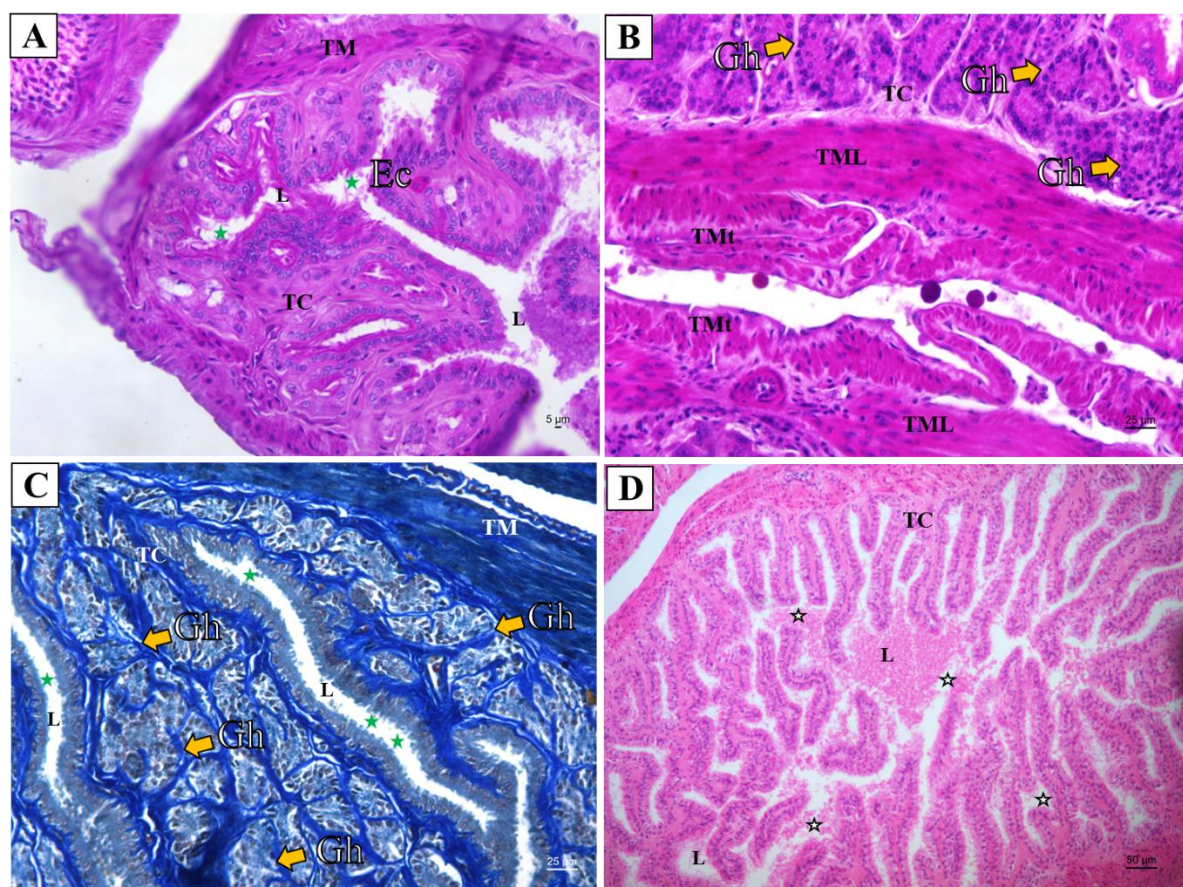


Figura 16. Cortes histológicos longitudinais do trato reprodutor das fêmeas de *Micrurus corallinus*, coletados na zona litorânea, estação do verão. **(A)** regiões do infundíbulo posterior exibindo o epitélio ciliado bem desenvolvido. Objetiva de 10x. Escala 5 µm. H/E. **(B)** infundíbulo posterior com glândulas hipertrofiadas e com as camadas do tecido muscular circular ou transversal (TMT) e longitudinal (TML). Objetiva de 20x. Escala 25 µm. H/E. **(C)** oviduto anterior exibindo epitélio ciliado desenvolvido e glândulas hipertrofiadas. Objetiva de 20x. Escala 25 µm. Coloração Tricrômico de Touchman. **(D)** Oviduto posterior exibindo o lúmen com maior quantidade de muco. Objetiva de 10x. Escala 25 µm. H/E. **(Ec)** Epitélio ciliado. **(Gh)** glândula hipertrofiada **(TM)** Tecido muscular. **(TC)** Tecido conjuntivo. **(L)** Luz do oviduto. **(Seta amarela)** glândula ovidutal. **(Estrela verde)** epitélio com cílios desenvolvidos. **(Estrela branca)** muco na luz do oviduto.

Estação Outono

O infundíbulo posterior apresentou uma pequena diminuição de glândulas hipertrofiadas, foi observado regiões com máxima concentração de secreção no lúmen. O oviduto anterior ainda exibe glândulas hipertrofiadas e em grande número. O oviduto posterior mostrou regiões com receptáculos, em sua maioria sem conteúdo interno; uma menor quantidade de glândulas no tecido conjuntivo, porém o epitélio ciliar estava bem desenvolvido e por quase toda a extensão deste (Figura 17).

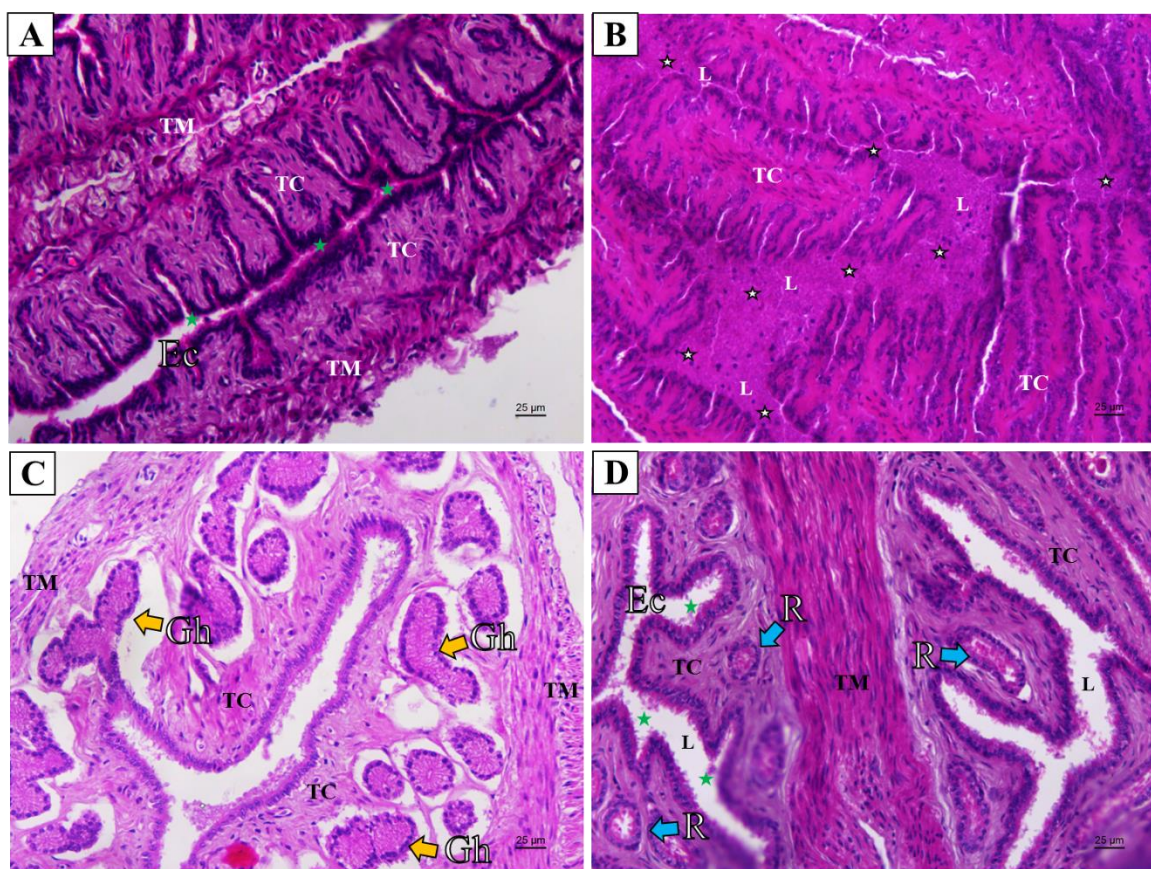


Figura 17. Cortes histológicos longitudinais do trato reprodutor das fêmeas de *Micrurus corallinus*, coletados na zona litorânea, estação do outono. Coloração hematoxilina-eosina. Objetiva de 20x. Escala 25 µm. **(A)** infundíbulo posterior com a camada epitelial ciliar. **(B)** infundíbulo posterior com máxima concentração de secreção no lúmen. **(C)** oviduto anterior exibindo glândulas hipertrofiadas. **(D)** Oviduto posterior exibindo receptáculos de ciliados com e sem conteúdo interno. **(Ec)** Epitélio ciliado. **(Gh)** glândula hipertrofiada. **(R)** receptáculo. **(TM)** Tecido muscular. **(TC)** Tecido conjuntivo. **(L)** Luz do oviduto. **(Seta amarela)** glândula hipertrofiada. **(Seta azul)** receptáculos com cílios. **(Estrela verde)** epitélio com cílios desenvolvidos. **(Estrela branca)** muco na luz do oviduto.

Estação Inverno

O infundíbulo posterior mostrou uma retração na espessura dos tecidos conjuntivo e muscular, o infundíbulo exibe poucas glândulas e baixa secreção no lúmen. O oviduto anterior e posterior ainda mantém o tecido conjuntivo espesso, os cílios do epitélio pouco evidente, não foram observados receptáculos (Figura 18).

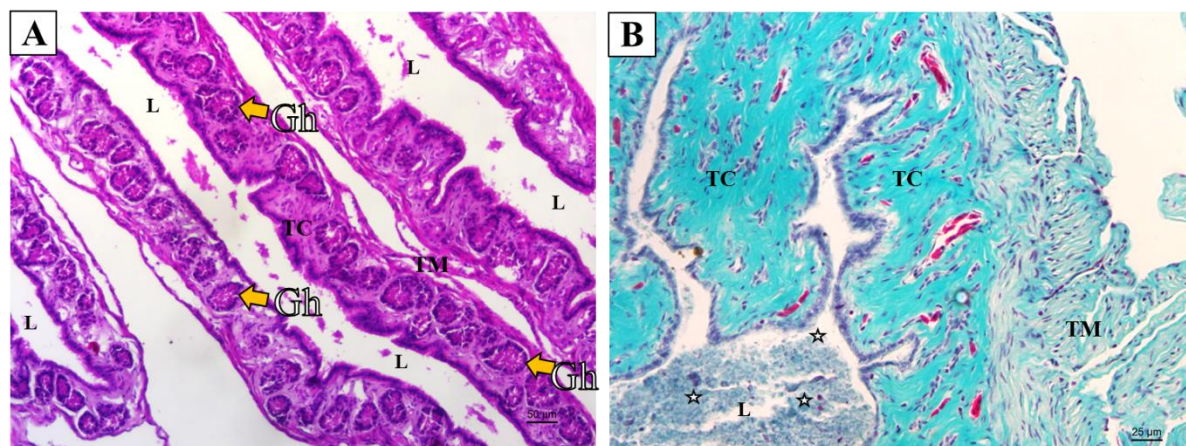


Figura 18. Cortes histológicos longitudinais do trato reprodutor das fêmeas de *Micrurus corallinus*, coletados na zona litorânea, estação do inverno. **(A)** infundíbulo posterior com os tecidos conjuntivo e muscular delgados, glândulas hipertrofiadas presentes. Objetiva de 10x. Escala 50 µm. H/E. **(B)** oviduto anterior com epitélio sem cílios e secreção no lúmen. Objetiva de 20x. Escala 25 µm. Coloração Tricrômico de Gomori. **(Gh)** glândula hipertrofiada. **(TM)** Tecido muscular. **(TC)** Tecido conjuntivo. **(L)** Luz do oviduto. **(Seta amarela)** glândula ovidutal. **(Estrela branca)** muco na luz do oviduto.

Resumo da análise histológica

Os dados comparativos da histologia foram resumidos em uma análise qualitativa, atribuindo valores usando o símbolo de (+). A análise feita foi em relação a algumas características morfológicas como arquitetura do epitélio, estado e quantidade das glândulas exócrinas presentes no tecido conjuntivo; quantidade de muco no lúmen ovidutal; quantidade de receptáculos ciliados.

Resumo da análise histológica do ciclo reprodutivo de *Micrurus corallinus* (análise qualitativa)

ZONA SUL	PRIMAVERA			VERÃO			OUTONO			INVERNO		
	Infund p	Ovi anter	Ovi post	Infund p	Ovi anter	Ovi post	Infund p	Ovi anter	Ovi post	Infund p	Ovi anter	Ovi post
→Arquitetura do epitélio	+++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	++	++	+++
→Conjuntivo												
*Estado de hipertrofia (GI)	++	++++	++++	+	+	+	++	++	++	++	++	+
*Concentração	++	++++	++++	+	+	+	++	+++	++	++	++	++
→Lúmen do oviduto												
*quantidade de muco	+++	++	+++	+++	+	+	++	++	+++	+++	++	++
→Receptáculos com grânulos												
*quantidade	+++	+	+++	+++	+	+++	+	+	+	+++	+	+++

ZONA LITORÂNEA	PRIMAVERA			VERÃO			OUTONO			INVERNO		
	Infund p	Ovi anter	Ovi post	Infund p	Ovi anter	Ovi post	Infund p	Ovi anter	Ovi post	Infund p	Ovi anter	Ovi post
→Arquitetura do epitélio	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	+++	+++	+++
→Tecido conjuntivo												
*Estado de hipertrofia (GI)	++++	+++	+++	++++	+++	+++	+++	++++	++++	+++	+++	+++
*Concentração	++++	+++	+++	++++	+++	+++	++	+++	++	++	+++	++
→Lúmen do oviduto												
*quantidade de muco	+++	+	+++	++++	+++	+++	++++	++	++	++	++	+
→Receptáculos com grânulos												
*quantidade	+++	+++	++++	++++	+++	++	++	+	+++	+	+	+

*Em vermelho diferenças significativas; (GI) glândular; (infund p) infundíbulo posterior; (Ovi anter) oviduto anterior; (Ovi post) oviduto posterior.

ESTOCAGEM DE ESPERMATOZOIDES

Dos espécimes analisados de *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis*, foi possível observar a estratégia de estocagem de espermatozoides pelas fêmeas das duas espécies (Tabela 2). A menor fêmea com estocagem pertencia a zona litorânea, aparentemente as fêmeas que apresentaram estocagem possuíam em sua maioria o Crc acima de 600 mm e a circunferência acima de 30 mm. A medida da circunferência pode servir como um indicador indireto de que a fêmea acumulou energia (gordura) para o ciclo reprodutivo.

Tabela 2. Dados dos espécimes que possuíam receptáculos de estocagem. Comprimento rostro-caudal (Crc).

Estação	Espécie	Local de estocagem	Crc (mm)	Circunferência (mm)
Primavera	<i>M. corallinus</i>	Oviduto posterior	548	25
Primavera	<i>M. corallinus</i>	Oviduto posterior	770	46
Primavera	<i>M. corallinus</i>	Oviduto posterior	725	49
Verão	<i>M. corallinus</i>	Oviduto posterior	710	41
Outono	<i>M. corallinus</i>	Oviduto posterior	663	37
Inverno	<i>M. corallinus</i>	Oviduto anterior	930	43
Primavera	<i>M. frontalis</i>	Oviduto posterior	770	42
Verão	<i>M. frontalis</i>	Oviduto posterior	770	32
Outono	<i>M. frontalis</i>	Oviduto posterior	825	51
Outono	<i>M. frontalis</i>	Oviduto anterior	685	32

A região com maior incidência de receptáculos ou tubos de estocagem em ambas as espécies foi o oviduto posterior, os períodos de maior evidência da presença destes receptáculos pode indicar o provável período de cópula, no caso para *M. corallinus* a primavera e para *M. frontalis* o outono. Os locais do oviduto com estocagem possuíam o epitélio simples colunar ciliado (Figura 19) e o entorno dos receptáculos com a presença de vasos capilares (Figura 19D).

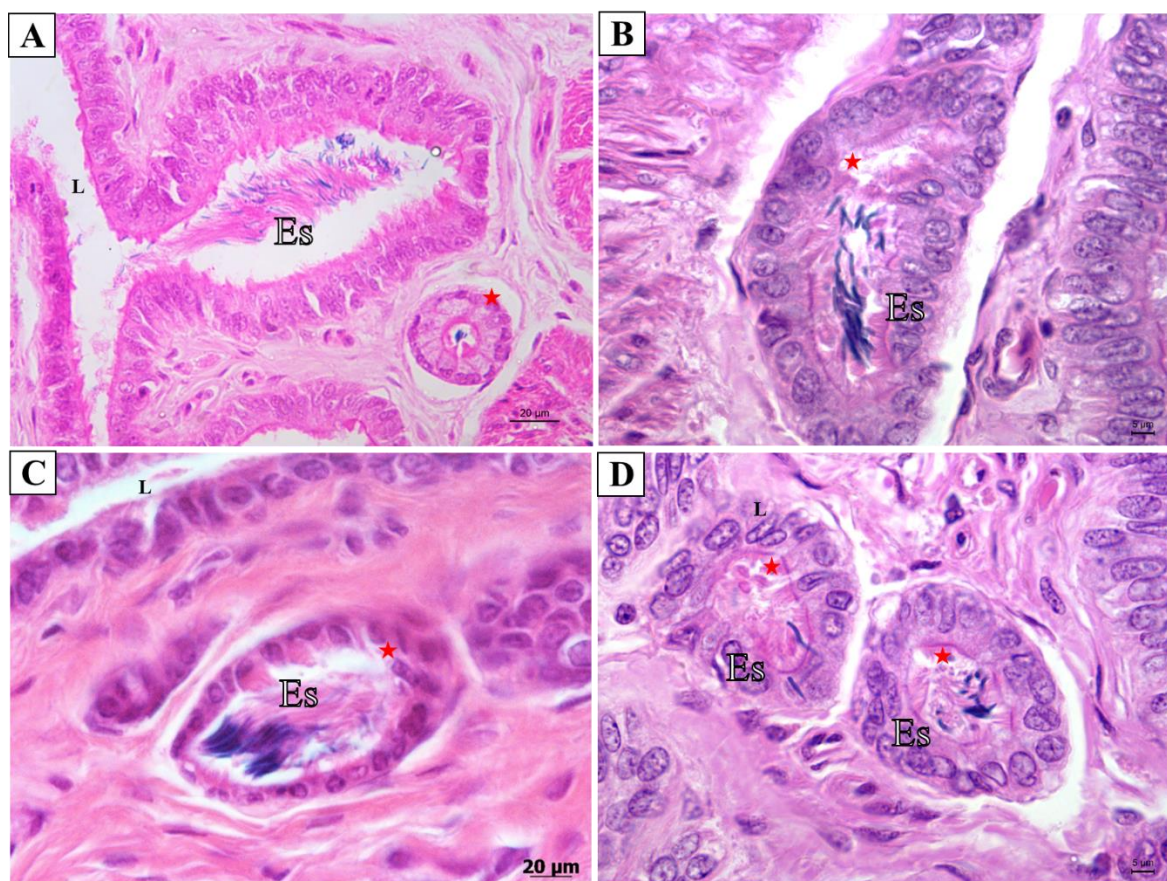


Figura 19. Cortes histológicos longitudinais da região do oviduto de *Micrurus corallinus*, apresentando receptáculos e túbulos de estocagem de espermatozoides. Corados em H/E. **(A)** espécime coletado na primavera. Objetiva de 40x. Escala 20 µm. **(B)** espécime coletado no verão. Objetiva de 40x. Escala 10 µm. **(C)** espécime coletado no outono. Objetiva de 100x. Escala 20 µm. **(D)** oviduto anterior, espécime coletado no inverno. Objetiva de 40x. Escala 10 µm. **(Estrela vermelha)** indicando o receptáculo. **(L)** Luz do oviduto. **(Es)** espermatozoide.

RECEPTÁCULOS DE ESTOCAGEM

Estruturas com a mesma morfologia dos receptáculos de estocagem de espermatozoides, foram encontradas em ambas as espécies. Porém ao invés de estocarem espermatozoides algumas destas estruturas apresentavam um conteúdo denso e granular e outras estavam vazias. Os locais de maior concentração destes receptáculos estavam no infundíbulo posterior e oviduto posterior.

Dentre os espécimes analisados, os exemplares que apresentaram a maior concentração de receptáculos foram os de *M. corallinus* coletados na zona sul

(estação do inverno). Na primavera outros espécimes mostram o que aparenta ser a abertura destes receptáculos, liberando o conteúdo granular (Figura 20).

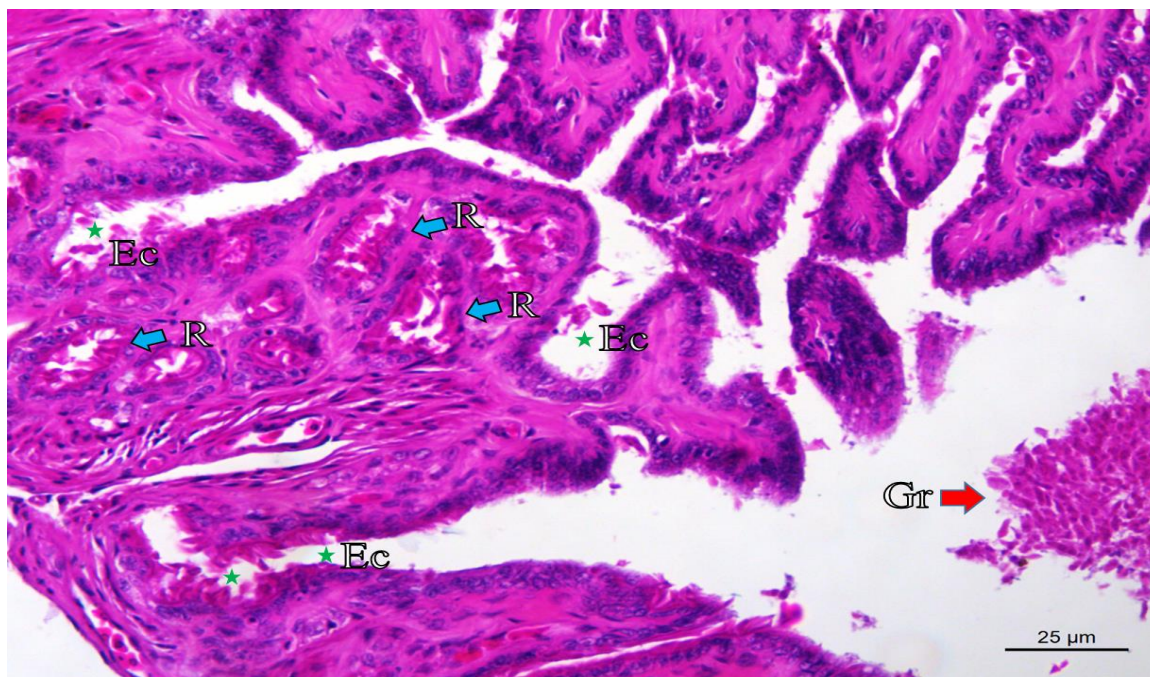


Figura 20. Corte histológico longitudinal do trato reprodutor da fêmea de *Micrurus corallinus*, coletado na zona sul, estação da primavera. Infundíbulo posterior exibindo receptáculos fechados (**Seta em azul**); receptáculos abertos (**Estrela verde**); na luz do oviduto grânulos indicados pela seta e vermelho. Objetiva de 20x. escala 25 µm. coloração H/E. (**Ec**) Epitélio ciliado. (**Gh**) glândula hipertrofiada. (**Gr**) grânulos. (**R**) receptáculo.

O mesmo espécime que apresentava a abertura destes receptáculos, possuía, na região do oviduto posterior, espermatozoides junto com o material granular que tinha sido liberado no lúmen (Figura 21A). Em outra região do oviduto posterior, há uma aparente internalização de espermatozoides (Figura 21B). Os locais próximos destes receptáculos, sempre exibiam o epitélio colunar simples e ciliado.

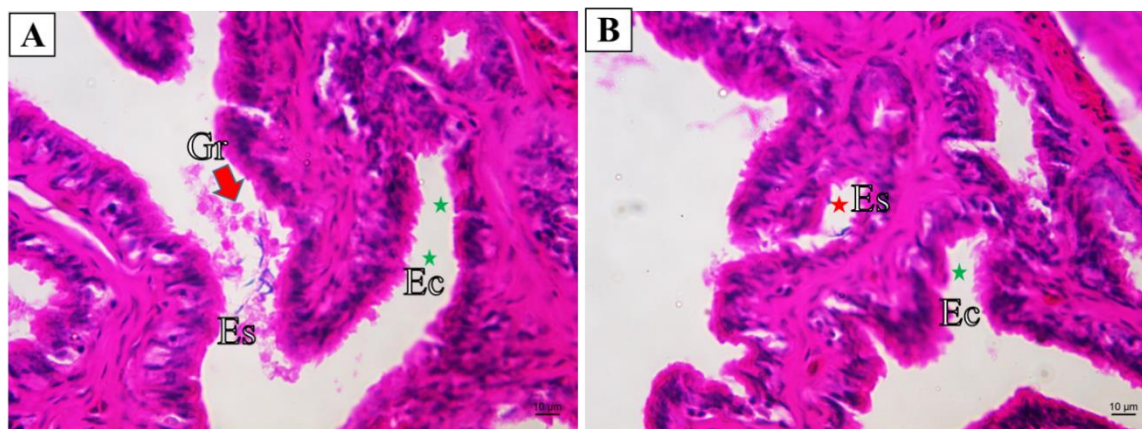


Figura 21. Cortes histológicos longitudinais do trato reprodutor das fêmeas de *Micrurus corallinus*, coletado na zona sul, estação da primavera. Objetiva de 40x. escala 10 µm. coloração H/E. **(A)** oviduto anterior exibindo no lúmen espermatozoides próximos a grânulos existentes. **(B)** oviduto posterior mostrando espermatozoides sendo internalizados. **(Seta vermelha)** indicando o grânulo na luz. **(Estrela verde)** epitélio com cílios desenvolvidos. **(Ec)** Epitélio ciliado. **(Es)** espermatozoide. **(Gr)** grânulo.

HISTOQUÍMICA: COLORAÇÃO DO ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF (PAS) NOS RECEPTÁCULOS E DO MUCO OVIDUTAL

A coloração do Ácido Periódico de Schiff (PAS) foi realizada nos receptáculos de estocagem presentes na região do oviduto posterior de exemplares de *Micrurus corallinus*. Nos receptáculos contendo o material denso e granular foi observado que o conteúdo possui porções reativas ao PAS (Figura 23A), como parte deste conteúdo não mostrou reatividade ao PAS, isto pode ser um indicativo que o conteúdo dentro do receptáculo não seja constituído de uma única substância.

Nos receptáculos contendo espermatozoides, foi possível constatar que tanto o citoplasma epitelial quanto no lúmen do receptáculo, haviam grânulos que reagiram positivamente ao PAS (Figura 22B), pela imagem observa-se que as células intercaladamente estavam liberando os grânulos na luz do receptáculo, onde estão os espermatozoides.

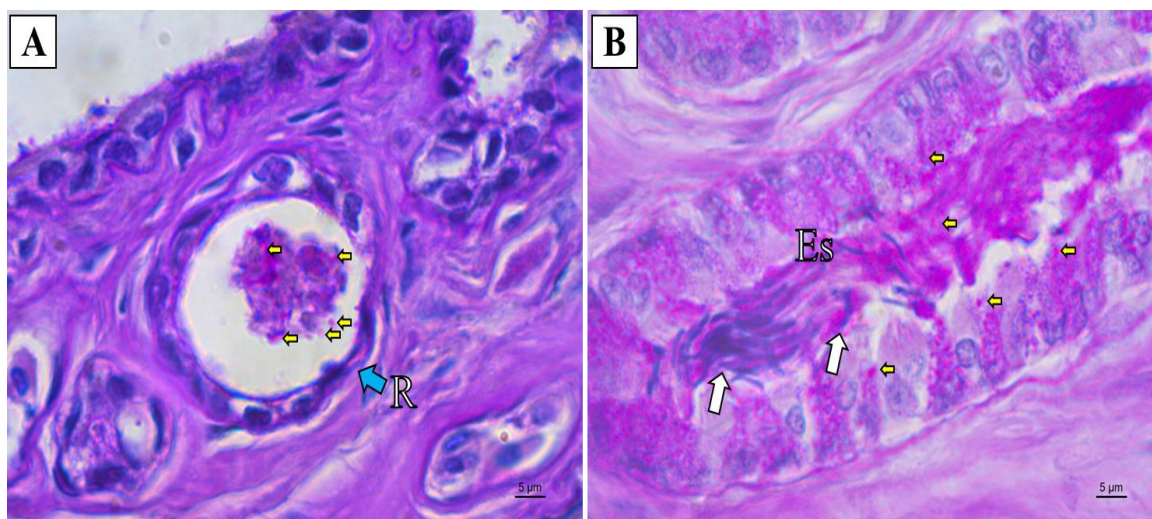


Figura 22. Cortes histológicos longitudinais do oviduto posterior de *Micrurus corallinus*. **(A)** receptáculo de estocagem indicado pela seta azul, contendo o material denso e granular. **(B)** túbulo de estocagem de espermatozoides, setas

brancas indicando os espermatozoides. Seta amarela indicando grânulo positivo ao PAS. Objetiva de 100x. escala de 5 µm.

As análises de PAS foram feitas em três regiões do oviduto (infundíbulo posterior, oviduto anterior e posterior), como resultado foi possível observar que parte do muco presente no lúmen ovidutal reagiu positivamente ao PAS, enquanto outras porções do muco permaneceram quase translúcidas a coloração (Figura 23A). Isto é uma evidência de que o muco possui ao menos duas origens de secreção, uma proveniente do epitélio ovidutal, no qual notasse secretivo e reativo ao PAS (Figura 23A, C), e outra parte do muco seria secretada pelas glândulas hipertrofiadas presentes no tecido conjuntivo, estas glândulas não mostraram reatividade ao PAS (Figura 23C). A secreção glandular foi notada pela formação de ductos excretores ligando a glândula com o lúmen (Figura 23D).

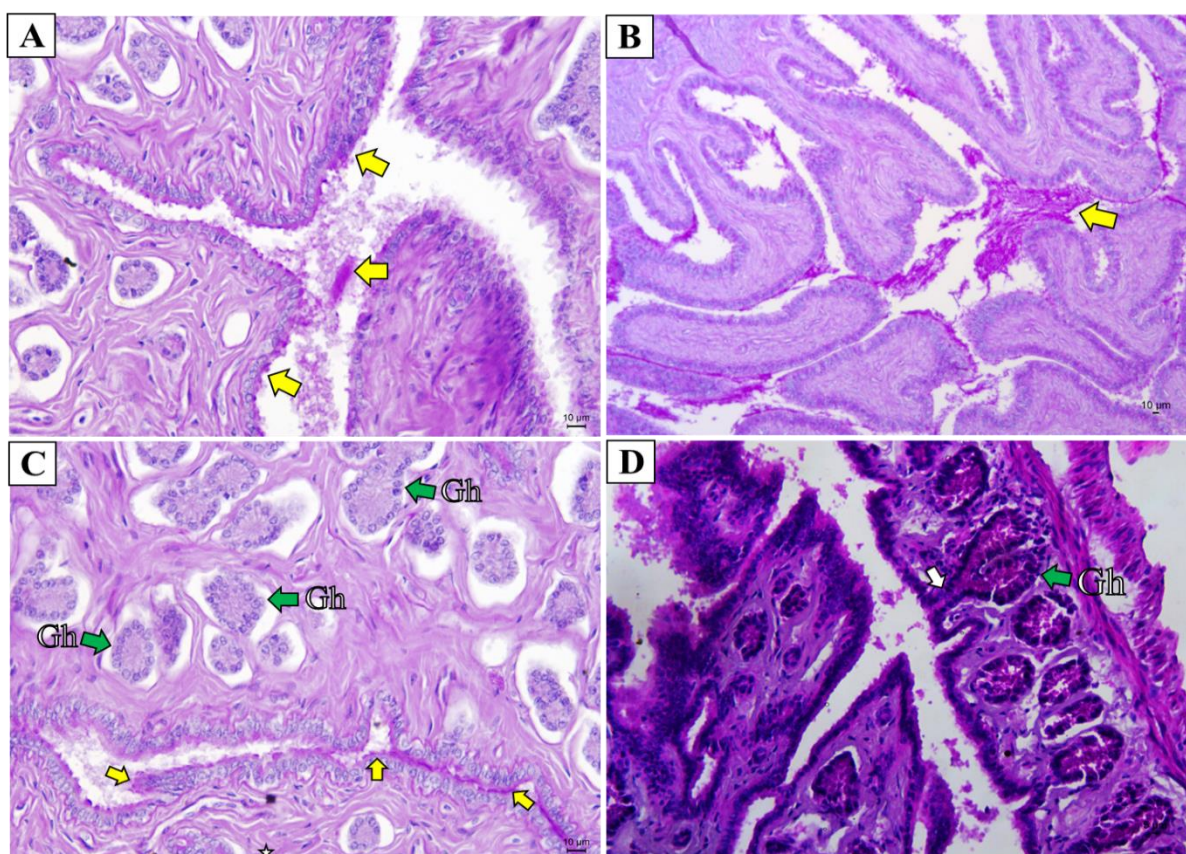


Figura 23. Cortes histológicos longitudinais do oviduto posterior de *Micrurus corallinus*. **(A, B e C)** porções do epitélio e do muco ovidutal que reagiram positivamente ao PAS indicados pela seta amarela. Coloração ácido periódico de Schiff. Objetiva de 10x, 20x e 10x. **(D)** Glândula hipertrofiada com ducto excretor indicado pela seta branca; coloração H/E. Objetiva de 20x. Escala de 10 µm. **(Gh)** glândula hipertrofiada seta verde.

HISTOQUÍMICA: COLORAÇÃO AZUL ALCIAN PH 2,5 (AB) E HEMATOXILINA

Os resultados obtidos foram os mesmos para as duas espécies. As regiões do infundíbulo e oviduto posterior, que apresentavam o epitélio simples colunar ciliado e alguns locais com epitélio pseudo-estratificado, tiveram como resultado reação positiva ao azul alcian (AB), além disso o epitélio mostrou-se secretivo. As glândulas exócrinas presentes no tecido conjuntivo, ao longo de todo o oviduto, não reagiram ao AB (Figura 24B, C).

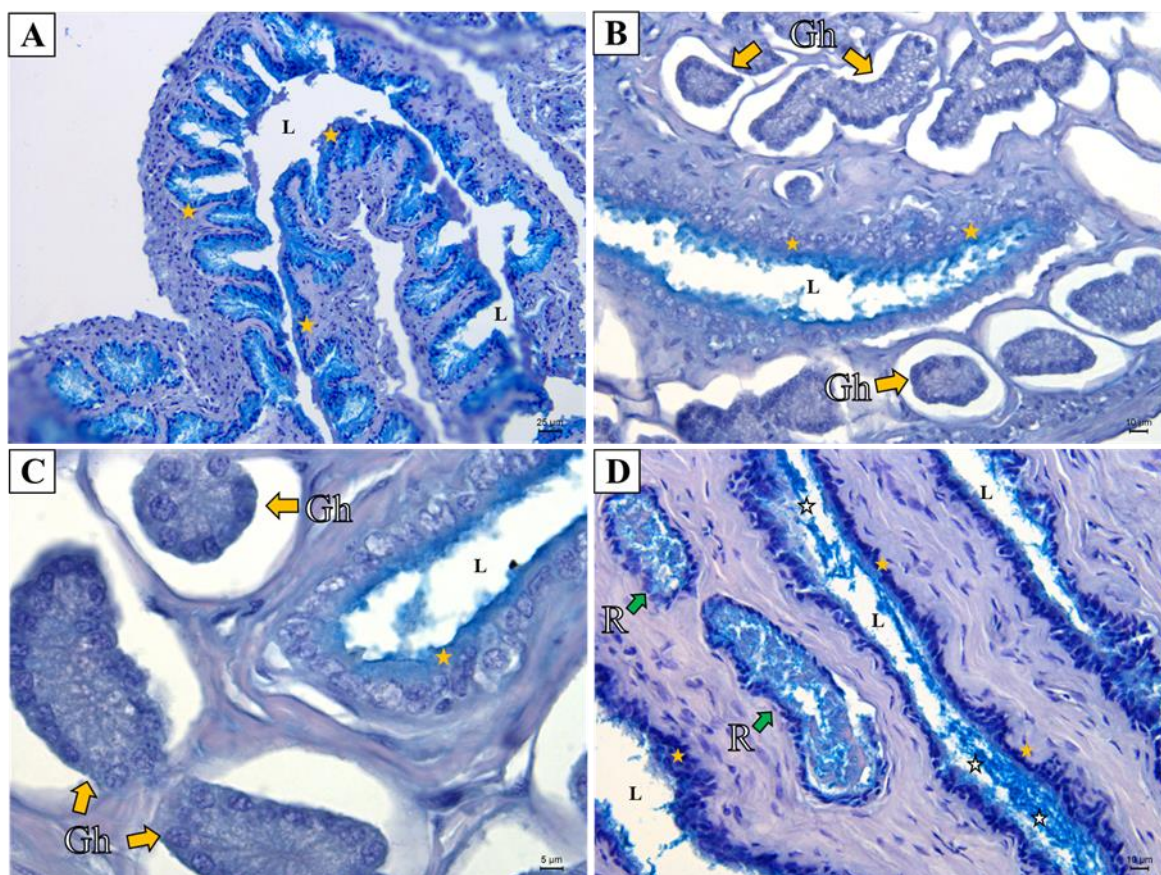


Figura 24. Cortes histológicos longitudinais do trato reprodutor das fêmeas de *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis* (A) infundíbulo posterior mostrando a região do epitélio positivo ao corante azul alcian (AB). Objetiva de 20x. Escala 25 μ m. (B e C) oviduto anterior, exibindo as glândulas exócrinas não reativas ao AB enquanto o epitélio e o muco reagiram positivamente. Objetiva de 40 e 100x. escala de 10 e 5 μ m (D) oviduto posterior exibindo o muco no lúmen e grânulos presentes no receptáculo positivos ao AB. Objetiva de 40x. Escala de 10 μ m. (Gh) glândula hipertrofiada seta amarela. (Estrela amarela) indicando local positivo ao azul alcian. (Estrela branca) muco na luz do oviduto. (R) receptáculo indicado pela seta verde. (L) luz ovidutal.

O muco presente no lúmen ovidutal exibiu regiões em que todo o muco foi reativo ao AB, entretanto havia locais que apenas parte deste reagiu positivamente (Figura 25). Nas comparações das lâminas é possível observar ao menos duas origens de secreção compondo o muco ovidutal, uma epitelial reativa ao AB e outra das glândulas exócrinas hipertrofiadas presentes no tecido conjuntivo, não reativa ao AB, assim sendo esta pode ser a explicação do porquê parte do muco ovidutal não reatividade a esta coloração.

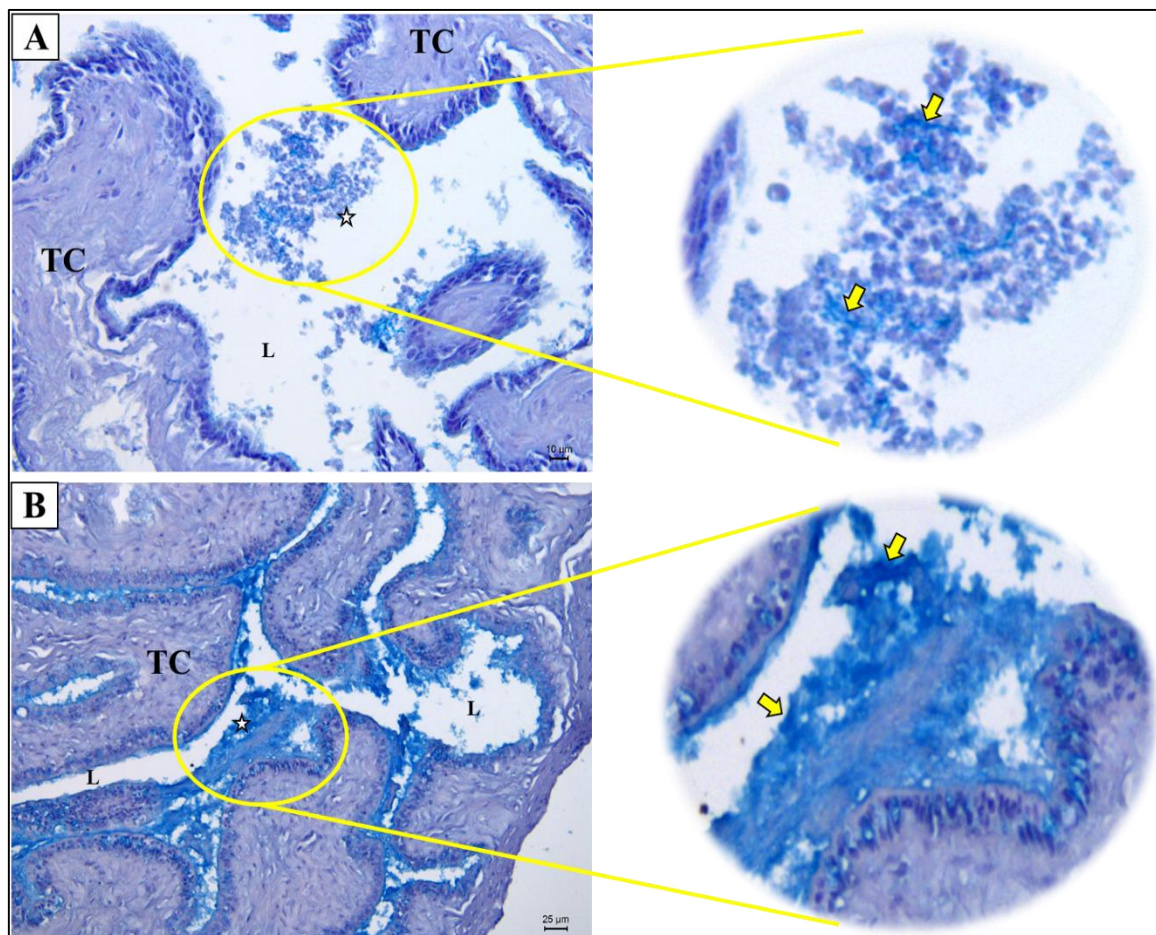


Figura 25. Cortes histológicos longitudinais do trato reprodutor das fêmeas de *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis* (A e B) oviduto posterior exibindo porções do muco no lúmen ovidutal positivos ao AB, indicado pela seta amarela. Objetiva de 40 e 20x. Escala de 25 e 10 µm. (Estrela branca) muco na luz do oviduto. (L) luz ovidutal. (TC) tecido conjuntivo.

Os receptáculos de estocagem apresentaram reação positiva ao AB, indicado pela reatividade das células ciliadas que compõe o epitélio e também do conteúdo armazenado. Porém alguns receptáculos com o conteúdo denso exibiram diferenças nas reações, alguns apenas com porções do conteúdo reativas ao AB e

outros com o conteúdo totalmente reativo ao AB (Figura 26). Este pode ser um indicativo que o do receptáculo sofra uma modificação ao longo do tempo.

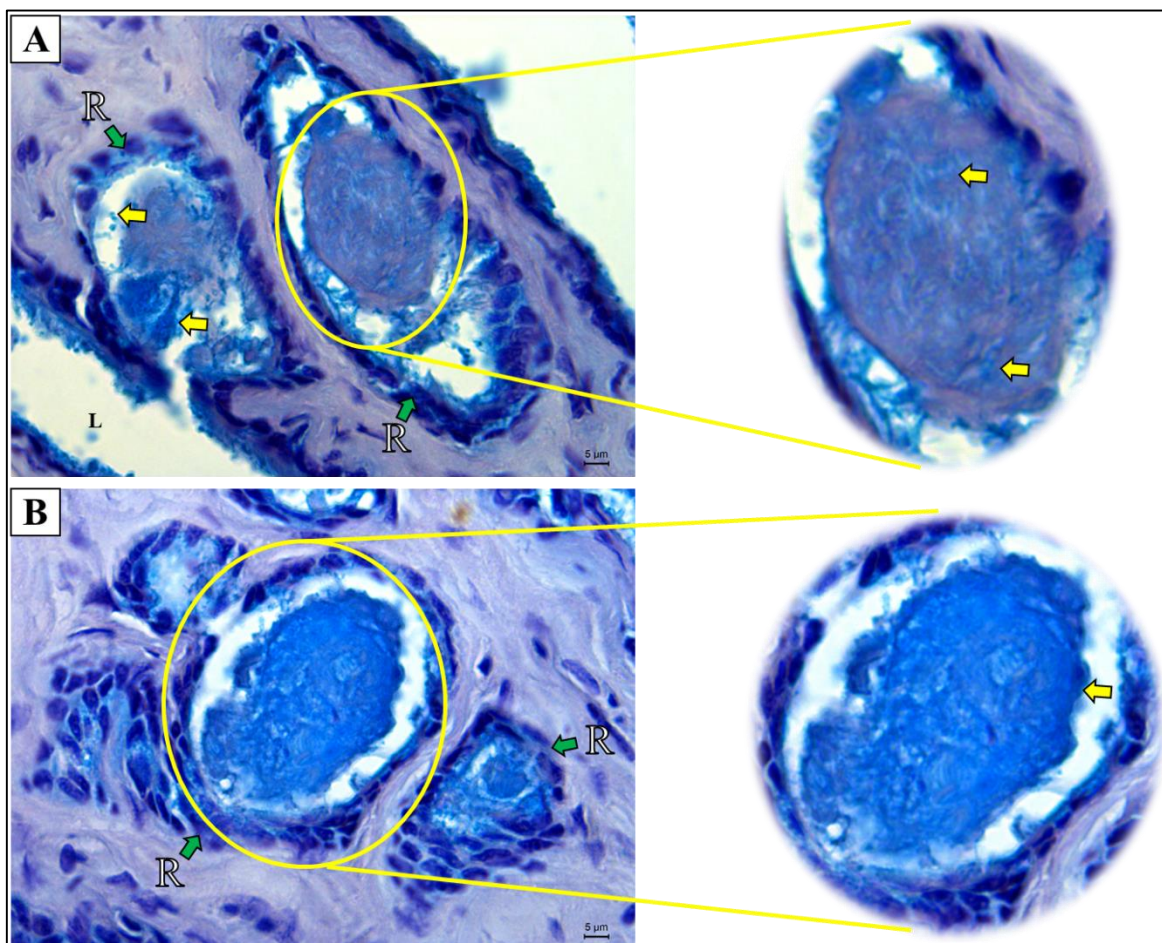


Figura 26. Cortes histológicos longitudinais do oviduto posterior de fêmeas de *Micrurus corallinus*. Objetiva de 100x. Escala de 5 µm. **(A)** receptáculos com conteúdo mostrando apenas algumas porções reativas ao azul alcian. **(B)** receptáculos com conteúdo totalmente reativo ao AB. **(Seta amarela)** indica região com reação positiva ao AB. **(L)** luz ovidutal. **(R)** receptáculo indicado pela seta verde.

HISTOQUÍMICA: COLORAÇÃO AZUL DE BROMOFENOL (BB)

A coloração azul de bromofenol (BB) obteve os mesmos resultados em ambas as espécies. A análise foi realizada nas três porções do oviduto da fêmea, como resultado o epitélio não mostrou reação positiva ao BB, porém as glândulas exócrinas foram sensíveis a essa coloração, mais especificamente em seu interior é possível observar os grânulos que ficaram com a cor mais intensa indicando a presença de proteínas (Figura 27). O muco ovidutal também obteve reação positiva ao BB.

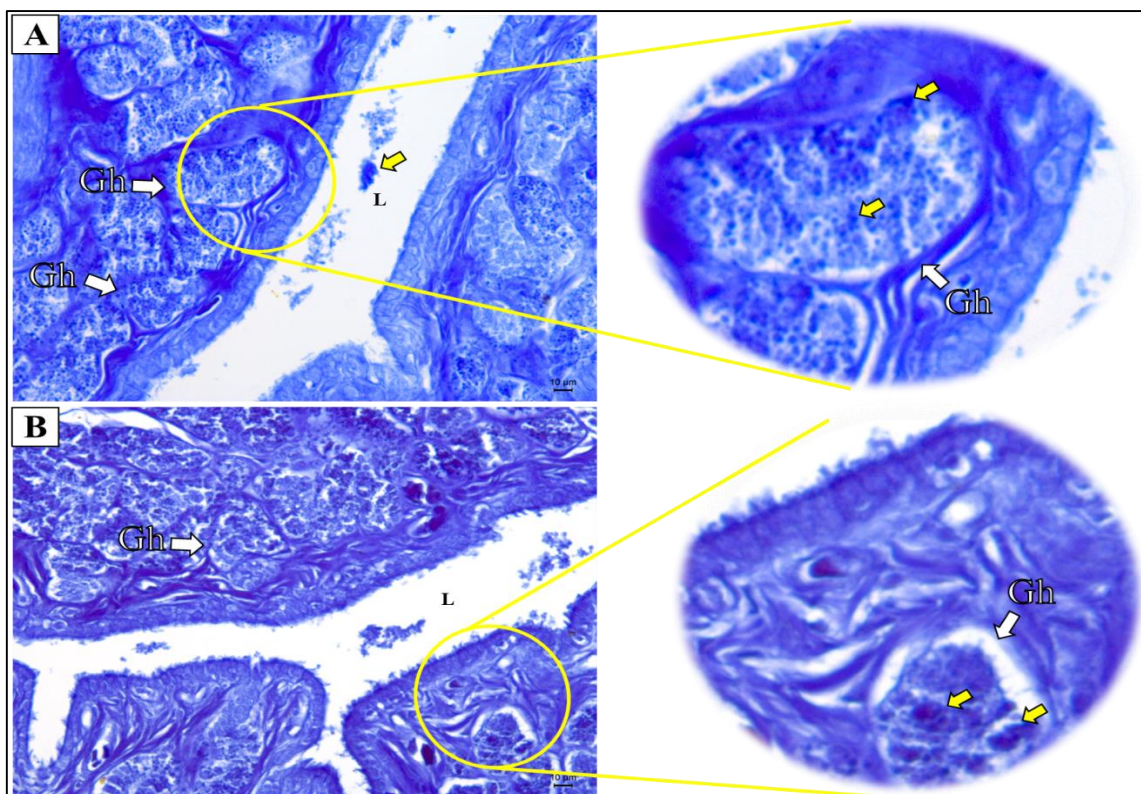


Figura 27. Cortes histológicos longitudinais do oviduto anterior e posterior de *Micrurus frontalis*. Objetiva de 40x. Escala de 10 μ m. **(A)** oviduto anterior, exibindo as glândulas exócrinas e muco ovidutal com reação positiva ao azul de bromofenol (BB). **(B)** oviduto posterior mostrando a glândula com o conteúdo reativo ao BB, em detalhe à direita, em maior aumento. **(Gh)** glândula hipertrofiada indicado pela seta branca. **(Estrela amarela)** indicando local positivo ao azul de bromofenol. **(L)** luz ovidutal.

Os receptáculos presentes no oviduto posterior foram testados para essa coloração e os grânulos no interior deste teve reação positiva ao BB. E apenas parte das células que compõe epitélio dos receptáculos foram reativos ao BB.

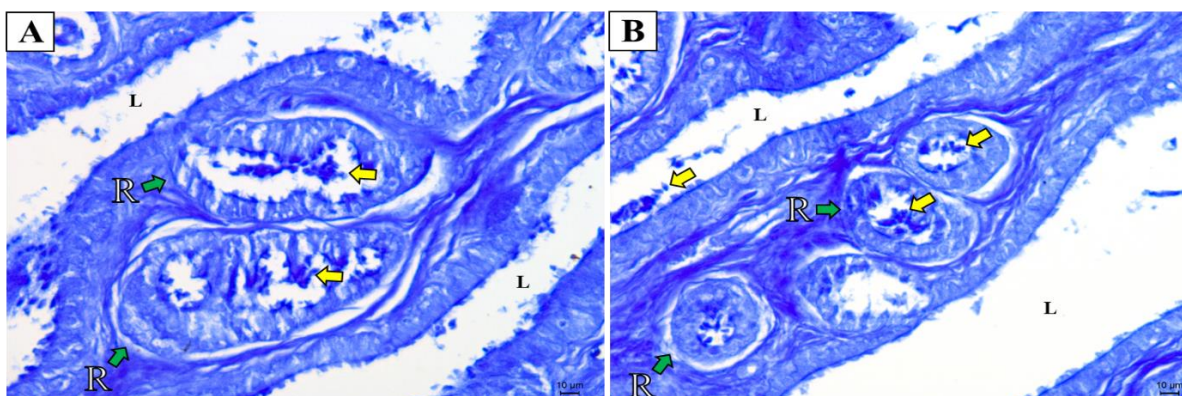


Figura 28. Cortes histológicos longitudinais do oviduto posterior de fêmeas de *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis*. Objetiva de 40x. Escala de 10 μ m. **(A e B)** receptáculos com conteúdo mostrando grânulos e muco positivos ao azul de bromofenol. **(L)** luz ovidutal. **(R)** receptáculo indicado pela seta verde. **(Seta amarela)** indicando região positiva ao azul de bromofenol.

DISCUSSÃO

SISTEMA REPRODUTOR DAS FÊMEAS

O sistema reprodutor das fêmeas apresentou uma assimetria em sua conformação, sendo o lado direito mais cranial que o esquerdo em ambas as espécies. Na literatura existem algumas divergências em relação à nomenclatura das subdivisões do oviduto, devido as diferenças em relação a funcionalidade de cada porção e pelas variações encontradas na composição tecidual entre as espécies (PERKINS e PALMER 1996; GIRLING, 2002).

Existem duas revisões recentes sobre a morfologia e funcionalidade do oviduto, utilizando informações histológicas e uma análise comparativa englobando sete famílias de serpentes (BLACKBURN, 1998; GIRLING, 2002).

A nomenclatura mais abrangente, descreve que o sistema reprodutor feminino é representado pelo ovário, infundíbulo, útero (porção anterior e posterior) e vagina ou bolsa (PERKINS e PALMER, 1996; GIRLING, 2002; SIEGEL et al., 2011). Existe ainda a proposta de subdividir o útero, em útero glandular e aglandular (SIEGEL et al., 2011; ALMEIDA SANTOS et al., 2015).

O estudo anatômico comparativo geralmente utiliza como base a nomenclatura da anatomia humana, desta forma encontramos nomeações que se mostram podem ser inadequadas dependendo do grupo de animal estudado. Como por exemplo, a utilização do termo útero tanto para espécies ovíparas quanto vivíparas. Mesmo sendo um termo utilizado em aves, répteis e anfíbios; esta nomeação deveria passar por uma revisão porque existem diferenças morfofuncionais entre um útero de um primata, para “útero” de um ovíparo.

O termo útero normalmente trata da porção no sistema reprodutor feminino, no qual ocorre a implantação do óvulo ou oócito fecundado (zigoto) e posterior formação da placenta. Nos ovíparos não há implantação do ovo ou folículo vitelogênico fertilizado, muito menos a formação de qualquer estrutura que caracterize uma placenta.

O oviduto possui várias funções metabólicas essenciais, como por exemplo o de secretar hormônios esteroides (estrógeno e progesterona), principais

reguladores via eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (JONES, 2011). Assim como, o de atuar no transporte, produção de muco (ou matriz carreadora); formação da membrana da casca e calcificação do ovo. Desta forma, o presente trabalho não utilizou a nomeação de útero na subdivisão do oviduto, a porção correspondente foi nomeada de oviduto anterior e posterior. Como proposta, um termo que poderia ser empregado, ao invés de útero, seria tuba ovidutal em espécies ovíparas.

O sistema reprodutor das fêmeas passa por sucessivas transformações durante o ciclo reprodutivo, correspondentes a fase reprodutiva e não reprodutiva. As modificações observadas no oviduto, decorrem da preparação para execução de diferentes tarefas, como a de capitar, acomodar e transportar o ovo do ovário à cloaca. A análise destas alterações, macroscópicas dos folículos ovarianos e histológicas do oviduto, permitem a compreensão e determinação dos períodos de cada fase do ciclo.

ANÁLISE DO CICLO E COMPARAÇÃO ENTRE AS FÊMEAS DE *MICRURUS CORALLINUS* DAS ZONAS SUL E LITORÂNEA.

Dentro dos elapídeos pode se encontrar diferentes ciclos reprodutivos (SHINE, 2003; MARQUES et al., 2013). Regiões que possuem condições ecológicas extremas ou ambientes que sofram mudanças drásticas, por ação antrópica por exemplo, forçam as cobras corais a se adaptarem as condições existentes (ROZE, 1996). Porém, ainda há uma escassez de informações referente as serpentes corais, principalmente pelo grande número de espécies presentes na América do sul (MARQUES et al., 2013).

As variações intraespecíficas já foram observadas em algumas serpentes, Pizzatto et al. (2006) constataram que tanto o padrão de atividade quanto o ciclo reprodutivo das fêmeas de *Liophis miliaris*, eram diferentes entre as populações devido as diferenças de temperatura entre as áreas amostradas.

A análise histológica comparativa da espécie *Micrurus corallinus*, mostrou que as fêmeas da zona sul apresentam alterações morfológicas do sistema reprodutor, correspondentes a fase reprodutiva, de uma forma branda ou menos intensa; quando comparadas com as fêmeas da zona litorânea. É possível que o pico da fase reprodutiva nas fêmeas da zona sul seja rápido e num período curto,

enquanto que para as fêmeas da zona litorânea o pico da fase reprodutiva é alcançado de forma mais gradual e por um período maior.

As modificações que se apresentaram de forma mais intensa nas fêmeas da zona litorânea, foram: grande quantidade de glândulas hipertrofiadas; altura da região epitelial (evidenciando um epitélio colunar, propriamente dito); um espessamento das camadas conjuntiva e muscular; síntese e secreção de muco na luz do oviduto.

O diferencial observado nas fêmeas da zona sul, foi o aumento expressivo de receptáculos estocando aparentemente algum material denso e granulado na estação do inverno. No outono (estação anterior) tanto no infundíbulo quanto no oviduto posterior apresentaram um aumento de muco no lúmen ovidutal, ou seja, é possível que o material presente nos receptáculos seja o próprio muco; que foi internalizado e estocado.

Os receptáculos com o material condensado possuem a mesma característica morfológica dos receptáculos que armazenam os espermatozoides, ou seja, ambos são receptáculos com epitélio colunar ou cuboide ciliados. Aparentemente o epitélio em torno dos receptáculos, estão com grande hipertrofia dos cílios. Possivelmente a formação dos receptáculos ocorra por um processo de invaginação com consequente fechamento, no qual captaria os grânulos ou espermatozoides presentes no lúmen ovidutal.

Em algumas espécies de serpentes como *Agkistrodon piscivorus* (SIEGEL e SEVER, 2008), *Diadophis punctatus* (PERKINGS e PALMER, 1996) foi descrito que células secretoras ou até mesmo o próprio receptáculo, produziram grânulos ricos em carboidratos neutros, assim existe a hipótese que estes grânulos atrairia os espermatozoides para os receptáculos (SIEGEL et al., 2011). Rojas et al. (2015) analisando a espécie *Philodryas patagoniensis*, obtiveram alta reatividade ao PAS, dos receptáculos de estocagem na presença dos espermatozoides.

No presente trabalho foi constatado que para *M. corallinus* e *M. frontalis* há reação positiva ao PAS, AB e BB dos receptáculos de estocagem, indicando que o material secretado possui porções ricas em carboidratos neutros, mucopolissacarídeos ácidos e proteínas. Os receptáculos estocando espermatozoides indicaram reatividade ao PAS e foi possível notar que o próprio

epitélio do receptáculo estava secretando o material reativo ao PAS e AB. Também foi evidenciado que alguns receptáculos aparentavam estar “abertos” liberando o material em seu interior no lúmen ovidutal. Então os receptáculos poderiam sintetizar um material que ajudaria a atrair os espermatozoides para dentro dos receptáculos ou túbulos de estocagem e posteriormente estando estes armazenados, o próprio receptáculo secretaria grânulos que permitiriam a sobrevivência dos espermatozoides.

A questão que persiste seria qual mecanismo que indicaria o momento certo, em que os espermatozoides estariam no lúmen, sinalizando a abertura dos receptáculos e liberação dos grânulos na luz do oviduto? Isso aconteceria por algum estímulo da cópula ou por contato dependência dos espermatozoides no oviduto?

A histoquímica dos receptáculos permitiu observar que possivelmente o conteúdo denso ou granular em seu interior sofria modificações ao longo do tempo. Alguns receptáculos apresentaram o conteúdo totalmente reativo ao AB para pH 2,5 enquanto outros receptáculos apenas mostraram porções reativas, inclusive um dos receptáculos estava aberto liberando o seu conteúdo.

Na comparação entre as duas zonas foi possível observar que as modificações da fase reprodutiva, ocorreram com maior intensidade e por um período maior nos espécimes da zona litorânea. Ao passo que as fêmeas da zona sul, essas modificações foram menos expressivas e por um período menor.

Teoricamente os animais ectotérmicos irão reagir conforme as condições ambientais existentes. No caso das serpentes, a temperatura, pluviosidade e disponibilidade de alimento, podem ser considerados direta ou indiretamente fatores essenciais para o padrão de atividade do indivíduo.

O metabolismo dos animais irá se ajustar as condições ambientais disponíveis, ou seja, em uma região com uma amplitude térmica menor, sem um período de frio marcante e uma distribuição mais homogênea das chuvas; isso poderia prolongar o período de atividade (e.g., alimentação, alocação de energia e procura por parceiros).

As fêmeas da zona litorânea antes do início da primavera já apresentavam a arquitetura morfológica da fase reprodutiva, ao mesmo tempo foi observado que uma das fêmeas da zona litorânea, coletada no inverno, apresentava

espermatozoides no oviduto posterior (próximo da vagina). Logo o período de cópula estaria antecipado, por ter acontecido no inverno. Em contra ponto, as fêmeas da zona sul, somente apresentaram a morfologia da fase reprodutiva na metade da primavera.

A hipótese dos eventos reprodutivos terem ocorrido antecipadamente nas fêmeas da zona litorânea e tardiamente nas fêmeas da zona sul, provêm do inverno com temperaturas mais baixas no sul do país. Esta diminuição térmica causaria uma queda metabólica, logo a resposta fisiológica para o início da fase reprodutiva aconteceria apenas quando a energia térmica do ambiente alcançasse condições mínimas para tal, ou seja, no meio da estação da primavera.

Em regiões tropicais o acasalamento tende a ser ritmado pela alternância dos períodos de chuva e de estiagem, basicamente as cobras corais tropicais tendem a se acasalar no período de seca e realizar a oviposição em um período próximo a época das chuvas (ROZE,1996). Porém a própria complexidade climática dentro do bioma, isto é, diferenças locais do regime de chuva e de temperatura; podem contribuir para o aparecimento de modificações no ciclo reprodutivo. Desta forma, a espécie ou população desta, podem apresentar modificações reprodutivas com o passar do tempo, levando a alterações intraespecíficas.

As condições de disponibilidade de alimento podem também influenciar nas variações intraespecíficas na reprodução (SANTOS et al., 2005). Os ambientes que possuem uma baixa amplitude térmica e uma homogeneidade na umidade ou na distribuição das chuvas podem ter uma maior oferta de alimento ao longo do ano. (BEGON et al., 1990; PIZZATTO et al., 2006).

Marques (1992, 1996) descreveu o ciclo da fêmea de *Micrurus corallinus* apresentando os folículos vitelogênicos na primavera, primeira metade da estação chuvosa; e foi sugerido pelo autor (1992) que não haveria diferenças geográficas no ciclo, ou seja, o ambiente não modificaria a vitelogênese e ovulação na espécie.

Entretanto mesmo não sendo possível fazer a separação do gráfico do folículos vitelogênicos entre as zonas no presente trabalho, no manuscrito de Marques (1992) é apresentada essa separação dos gráficos e ao comparar o período de crescimento folicular dos espécimes de Santa Catarina (sul do país), com os exemplares de localidades termicamente mais quente ou homogêneas

(interior de São Paulo, Minas gerais e Rio de Janeiro); observa-se que em locais com o frio mais intenso o período de vitelogênese é mais estreito ou curto enquanto que em localidades com o frio menos rigoroso há uma expansão ou prolongamento do período de vitelogênese e ovulação.

No gráfico de dispersão dos folículos expostos no presente trabalho, o folículo vitelogênico secundário (maior que 25 mm), presente no final de junho (outono), pertence a uma fêmea coletada no Rio de Janeiro (região litorânea). Isso pode ser considerado um indicativo que o ciclo tenha se estendido, porém a confirmação deste pode ser corroborada com o aumento do número amostral das fêmeas coletadas no outono.

CICLO REPRODUTIVO DE *MICRURUS FRONTALIS*

O grupo *Micrurus* possui uma grande escassez de informações detalhadas em relação a dados relativos ao ciclo reprodutivos das espécies do gênero (MARQUES et al., 2013). Os dados existentes indicam que há uma variabilidade dos períodos de reprodução entre as linhagens BRM e BRT, existem muitos fatores que podem estar relacionados, dentre estes, as condições climáticas do ambiente podem estar diretamente envolvidas.

A espécie *Micrurus frontalis* possui a distribuição ocorrendo no bioma Cerrado, tendo como característica um ambiente mais seco e com clima sazonalmente definido entre período de chuvoso e de estiagem, quando comparado com o Bioma Mata Atlântica.

Populações que ocorrem em ambientes mais sazonais tendem a ter ciclos reprodutivos mais definidos ou com eventos bem demarcados no ano, quando comparados com espécies que passam por climas mais homogêneos ao longo do ano (CAMPBELL e LAMAR, 2004). E diferentemente de *M. corallinus*, *M. frontalis* exibiu as características condizentes ao ápice da fase reprodutiva na metade do verão e ao longo da estação do outono.

Existe uma ausência de dados em relação a reprodução da espécie *M. frontalis*, principalmente por algumas divergências taxonômicas para o complexo de subespécies. O trabalho de Silva-JR. e Sites (1999), até o presente momento, definiu algumas características que permitiram a elevação de algumas subespécies

para espécie. Os dados sobre o complexo de subespécies de *M. frontalis*, referentes ao ciclo reprodutivo, falam que a oviposição ocorreria nos meses quentes do ano de novembro a janeiro; e o período de eclosão dos filhotes de fevereiro até o final do outono (ROZE,1996). Marques et al., (2013) apresentaram para as fêmeas de *M. frontalis* que a vitelogênese secundária ocorreria de fevereiro a setembro; e ovulação em janeiro e agosto.

Considerando as características e alterações do oviduto, que indicariam uma preparação para captação dos folículos vitelogênicos pré-ovulatórios, ou seja, ápice do período reprodutivo. A análise histológica mostrou que da estação primavera ao outono houve progressivas modificações na arquitetura do epitélio, tecido conjuntivo, aumento do número de glândulas exócrinas e hipertrofia destas. Então, a fase ápice do período reprodutivo seria atingida no outono (início da estação seca).

Com base nos dados do comprimento folicular aqui expostos e os apresentados por Marques et al., (2013), observa-se que a vitelogênese tende a ocorrer mais intensamente ao longo do período seco, o que corrobora a análise histológica. Na estação do outono foi relatado o combate de dois machos na região de Minas Gerais, coincidindo também com a fase reprodutiva da fêmea.

Os receptáculos de estocagem foram encontrados nas três estações analisadas, isso pode ocorrer por duas hipóteses. A primeira seria que a cópula pode ocorrer eventualmente em qualquer época do ano, assim os espermatozoides poderiam ser armazenados em receptáculos até a época de ovulação. A segunda seria que nem todos os receptáculos se abriam no momento da ovulação, como foi encontrado em *Philodryas patagoniensis* (ROJAS et al., 2015), alguns poderiam eventualmente permanecer para o próximo ciclo reprodutivo garantindo a fecundação, aumentando assim a competição espermática em cópulas posteriores.

ESTRATÉGIA DE ESTOCAGEM DOS ESPERMATOZOIDES

Esta é a primeira confirmação e descrição da estratégia de estocagem de espermatozoides pelas fêmeas no grupo *Micrurus*. O fato da fêmea apresentar receptáculos de estocagem em todas as estações em *Micrurus corallinus*, leva à tona novas hipóteses desta estratégia reprodutiva: seria esta estratégia uma forma

de garantir a fecundação para próxima ovulação? Garantindo assim a próxima ninhada, caso a fêmea não encontre um macho?

A localização dos receptáculos de estocagem, sendo no oviduto posterior, difere da maioria dos relatos desta estratégia. Muitos autores descreveram para Viperidae e Colubridae a estocagem acontecendo em duas regiões no infundíbulo posterior ou na junção útero-vagina (JUV) (SIEGEL et al., 2011; ROJAS et al., 2015). Almeida-santos e Salomão (1997) tratam da estocagem acontecendo na JUV, pelo mecanismo *uterine muscular twisting* (UMT), local onde seria parte do oviduto posterior, porém sem a formação de receptáculos.

Outros autores observaram a ocorrência de espermatozoides na luz do oviduto posterior (PERKINS e PALMER, 1996; SIEGEL e SEVER, 2008) porém isso aconteceria por um período curto ou uma estação somente (normalmente após um período de hibernação), depois os espermatozoides migravam para o infundíbulo posterior. A localização dos receptáculos ou túbulos no oviduto anterior e posterior nas duas espécies leva a alguns questionamentos da região onde ocorre a fertilização, por se tratar de um local afastado do óstio infundibular (local de entrada do folículo vitelogênico ovulado ou ovo). Possivelmente em um período próximo da ovulação os receptáculos sejam abertos e ocorra a migração destes para a área infundibular.

CONCLUSÕES

- i. O ciclo das fêmeas de *Micrurus corallinus* pode ser classificado como pré-nupcial e os eventos reprodutivos são influenciado pelas condições de temperatura e pluviosidade, assim sendo estas possuem plasticidade de expandir ou contrair o período de vitelogênese, ovulação e cópula.
- ii. As fêmeas de *Micrurus corallinus* da região sul atingem o pico da fase reprodutiva rapidamente e por um período curto. Enquanto que as fêmeas de localidades climaticamente mais homogêneas, atingem o pico de fase reprodutiva de uma forma mais gradual e com uma duração maior.
- iii. As fêmeas de *Micrurus frontalis* mostraram modificações no oviduto correspondentes a fase reprodutiva, da estação primavera ao outono, com ápice no outono. Ovos no oviduto foram evidenciados no verão.
- iv. O muco presente no oviduto possui ao menos duas origens de secreção, uma do epitélio ovidutal e a outra das glândulas presentes no tecido conjuntivo. Sendo possível observar isso nas análises histoquímica de PAS e azul alcian.
- v. As fêmeas de ambas as espécies apresentaram a estratégia de estocagem de espermatozoides. O local de estocagem ocorre prioritariamente na região do oviduto posterior. Em *M. corallinus* esta estratégia se concentra na estação da primavera enquanto em *M. frontalis* no outono.
- vi. Os receptáculos de estocagem secretam grânulos ricos em carboidratos em seu interior. Assim, possivelmente estes estejam envolvidos na manutenção e sobrevivência dos espermatozoides armazenados.

REFERÊNCIAS

AB'SABER, A.N. **Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas**. 2ªed. Atelié editorial, p.1-63. 2003.

ALMEIDA-SANTOS, S. Menuis; SALOMAO, D.A Gnnch. Long-Term Sperm Storage in the Female Neotropical Rattlesnake *Crotalus durissus terrrfficus*. **Japanese Journal of Herpetology**, v. 17, n. 2, p. 46-52, 1997.

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

ALMEIDA-SANTOS, S.M.; PIZZATTO, L.; MARQUES, O.A.V. Intra-sex synchrony and intersex coordination in the reproductive timing of the coral snake *Micrurus corallinus* (Elapidae). **Herpetological Journal**. Vol. 16, p. 371-376, 2006.

ALMEIDA-SANTOS, S.M.; BRAZ, H.B.; SANTOS, L.C.; SUEIRO, L.R.; BARROS, V.A.; ROJAS, C.A.; KASPEROVICZUS, K.N. Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados. **Herpetologia Brasileira**. V.3, n.1, p.14-24. 2014.

ANGILLETTA JR, M. J.; NIEWIAROWSKI, P. H.; NAVAS, C.A. The evolution of thermal physiology in ectotherms. **Journal of Thermal Biology**, v. 27, n. 4, p. 249-268, 2002.

BASSI, E. A. Histologia e morfometria para determinação do ciclo reprodutivo de *Micrurus corallinus* (serpentes, Elapidae). Monografia (trabalho de conclusão de curso). Universidade Estadual de Londrina, PR. 2013.

BEGON, M.; HARPER, J. L.; TOWNSEND, C. R. Ecology: Individuals, Populations and Communities. 1990.

BLACKBURN, D. G. Structure, function, and evolution of the oviducts of squamate reptiles, with special reference to viviparity and placentation. **Journal of Experimental Zoology**, v. 282, n. 4-5, p. 560-617, 1998.

BROWN, G. P.; SHINE, R. Influence of weather conditions on activity of tropical snakes. **Austral Ecology**, v. 27, n. 6, p. 596-605, 2002a.

BROWN, G. P.; SHINE, R. Reproductive ecology of a tropical natricine snake, *Tropidonophis mairii* (Colubridae). **Journal of Zoology**, v. 258, n. 1, p. 63-72, 2002b.

CALDWELL, M. W.; LEE, M. S. Y. A snake with legs from the marine Cretaceous of the Middle East. 1997.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. New York: Cornell University, 2004.

DA SILVA JR, N. J.; SITES JR, J. W. Phylogeny of South American triad coral snakes (Elapidae: Micrurus) based on molecular characters. **Herpetologica**, p. 1-22, 2001.

DE MESQUITA, P. C. M. D. et al. Ecology of *Philodryas nattereri* in the Brazilian semi-arid region. **The Herpetological Journal**, v. 21, n. 3, p. 193-198, 2011.

GIRLING, Jane E. The reptilian oviduct: a review of structure and function and directions for future research. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, n. 2, p. 141-170, 2002.

GIST, D.H. Hormones and the sex ducts and sex accessory structures of reptiles In: NORRIS, D.O.; LOPEZ, K.H. **Hormones and Reproduction of Vertebrates**. 1. Ed. San Diego. Elsevier, p 117-139. 2011.

HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T.; MARTINS, M. Ecology of a snake assemblage in the Atlantic forest of south Brazil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v.49, n.27, p. 343 - 360. 2009.

JONES, S.M. Hormonal regulation of Ovarion of function in reptiles. In: NORRIS, D.O.; LOPEZ, K.H. **Hormones and Reproduction of Vertebrates**. 1. Ed. San Diego. Elsevier, p 89-115. 2011.

JUNQUEIRA, L. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos, 1983.

LABIOCEL, Laboratório de biologia celular da faculdade de medicina da Universidade de São Paulo. Manual de técnicas em histologia e biologia celular do Laboratório de biologia celular da faculdade de medicina da Universidade de São Paulo. 2002. Disponível em
< <http://www.direxlim.fm.usp.br/download/manualtecnicas.pdf>>. Acesso em: 4/mar/2013.

LICHT, P. Environmental physiology of reptilian breeding cycles: role of temperature. **General and comparative endocrinology**, v. 3, p. 477-488, 1972.

LOURDAIS, O. et al. Capital-breeding and reproductive effort in a variable environment: a longitudinal study of a viviparous snake. **Journal of Animal Ecology**, v. 71, n. 3, p. 470-479, 2002.

LOVERN, M. B. Hormones and reproductive cycles in lizards. In: NORRIS, D. O.; LOPEZ, K. H. **Hormones and reproduction of vertebrates**. 1ªedição. New York: Elsevier, p.326-328. 2011.

MARQUES, O. A. V. História natural de *Micrurus corallinus* (Serpentes, Elapidae). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1992.

MARQUES, O. A. V. Reproduction, seasonal activity and growth of the coral snake, *Micrurus corallinus* (Elapidae), in the southeastern Atlantic forest in Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 17, n. 3, p. 277-285, 1996.

MARQUES, O. A. V.; ETEROVIC, A.; ENDO, W. Seasonal activity of snakes in the Atlantic forest in southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 22, n. 1, p. 103-111, 2001.

MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; RODRIGUES, M.G. Activity patterns in coralsnakes, genus *Micrurus* (Elapidae), in south and southeastern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v.1, n.2, p.99-105, 2006.

MARQUES, O. A.V; PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive Strategies of New World Coral Snakes, Genus *Micrurus*. **Herpetologica**, v. 69, n. 1, p. 58-66, 2013.

MATHIES, T. Reproductive cycles of tropical snakes. In: ALDRIDGE, R.D.; SEVER, D.M. **Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes**. Enfield: Science Publishers, p. 511-550. 2011.

MENDONÇA, F.; DANNI-OLIVEIRA, I. M. Climatologia: Noções básicas e climas do Brasil. São Paulo: Oficina de Textos, Cap, 7, p.83-112. 2007.

MUNIZ-DA-SILVA, D. F.; Ciclo reprodutivo da caninana, *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758) (serpentes:colubridae). Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, SP. 2013.

PERKINS, M. J.; PALMER, B. D. Histology and functional morphology of the oviduct of an oviparous snake, *Diadophis punctatus*. **Journal of Morphology**, v. 227, n. 1, p. 67-79, 1996.

PIZZATTO, L.; MARQUES, O. A. V. Interpopulational variation in reproductive cycles and activity of the water snake *Liophis miliaris* (Colubridae) in Brazil. **The Herpetological Journal**, v. 16, n. 4, p. 353-362, 2006.

PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; MARQUES, O. A. V. Biologia reprodutiva de serpentes brasileiras. in: NASCIMENTO, L. B.; OLIVEIRA, M. E. Herpetologia no Brasil II. (Eds.). Belo Horizonte: **Sociedade Brasileira de Herpetologia**, P. 201-221. 2007.

PIZZATTO, L.; CANTOR, M.; OLIVEIRA, J.L.; MARQUES, O.A.V.; CAPOVILLA, V.; MARTINS, M. Reproductive ecology of dipsadine snakes, with emphasis on South American species. **Herpetological**. v.62:168–179. 2008a.

PIZZATTO, L.; JORDÃO, R.S.; MARQUES, O. A. V. Overview of reproductive strategies in Xenodontini (Serpentes: Colubridae: Xenodontinae) with new data for *Xenodon neuwiedii* and *Waglerophis merremii*. **Journal of Herpetology** n.42, p.153–162. 2008b.

ROJAS, C. A.; BARROS, V. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. The reproductive cycle of the male sleep snake *Sibynomorphus mikanii* (Schlegel, 1837) from southeastern Brazil. **Journal of morphology**, n.274, v.2. p.215-228. 2013

ROJAS, C.A.; BARROS, V. A.; ALMEIDA-SANTOS, S.M. Sperm storage and morphofunctional bases of the female reproductive tract of the snake *Philodryas*

patagoniensis from southeastern Brazil. **Zoomorphology**, v. 134, n. 4, p. 577-586, 2015.

ROZE, J.A. Coral Snakes of the Americas: Biology, Identification and Venoms. **Krieger Publishing Company**, USA. 1996.

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

SANTOS, X.; LLORENTE, G. A.; FERICHE, M.; PLEGUEZUELOS, J. M.; CASALS, F.; DE SOSTOA, A. Food availability induces geographic variation in reproductive timing of an aquatic oviparous snake (*Natrix maura*). **Amphibia-Reptilia**, v. 26, n. 2, p. 183-191, 2005.

SEIGEL, R. A.; FORD, N. B. Phenotypic plasticity in reproductive traits: geographical variation in plasticity in a viviparous snake. **Functional Ecology**, v. 15, n. 1, p. 36-42, 2001.

SHINE, R. Reproductive strategies in snakes. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1519, p. 995-1004, 2003.

SIEGEL D. S, M. A.; CHABARRIA R.E, ALDRIDGE R.D. Female reproductive Anatomy: cloaca, oviduct, and sperm storage. In: Aldridge RD, Sever D.M (eds) Reproductive biology and phylogeny of snakes. CRC Press, Enfield, pp 347–409, 2011.

SLOWINSKI, J. B. A phylogenetic analysis of the New World coral snakes (Elapidae: *Leptomicrurus*, *Micruroides*, and *Micrurus*) based on allozymic and morphological characters. **Journal of Herpetology**, p. 325-338, 1995.

TAYLOR, E.N.; DENARDO, D.F; Hormones and reproductive cycles in snakes. In: NORRIS, D.O.; LOPEZ, K.H. **Hormones and Reproduction of Vertebrates**. 1. Ed. San Diego. Elsevier, p 355-372. 2011.

Capítulo II

Biometria e histologia no ciclo reprodutivo dos machos de
Micrurus corallinus e *Micrurus frontalis*

RESUMO

O dimorfismo sexual é uma das estratégias reprodutivas presentes em diversos grupos de serpentes, está pode ser constatada pela diferença de coloração, tamanho ou comprimento de diferentes partes anatômicas. A biometria dos machos constatou diferenças significativas entre machos e fêmeas de ambas as espécies. Em *Micrurus corallinus* as fêmeas possuem um comprimento rostro-cloacal (Crc) maior, enquanto que os machos exibem um comprimento de cauda significativamente maior (Ccau); proporcionalmente em relação ao corpo os machos possuem maior comprimento de cabeça, em ambas as espécies. Para *Micrurus frontalis* os machos também apresentaram uma maior Ccau. A biometria interna e a histologia tiveram resultados convergentes, o pico espermatogênico, a máxima hipertrofia do segmento sexual renal SSR (com secreção de grânulos) e a maior concentração de espermatozoides no ducto deferente distal, em *M. corallinus* foram na estação do inverno, aparentemente o macho se prepara para a época do acasalamento; como algumas fêmeas estão apresentando um adiantamento do período fértil, pode-se afirmar que os machos possuem o ciclo pós-nupcial. Em *M. frontalis* a histologia mostrou que na primavera ocorre um aumento da atividade testicular com uma elevação da espermiogênese, concomitantemente o segmento SSR exibiu hipertrofia com secreção no lúmen. No outono ocorre uma diminuição da atividade espermatogênica e do SSR, para esta espécie não foi observado diferenças no diâmetro do ducto deferente em nenhuma estação. A histoquímica dos grânulos do SSR mostrou que a composição destes é rica em carboidratos neutros e possui natureza proteica. Isso reforça a hipótese destes grânulos servirem como fonte de energia e manutenção da sobrevivência dos espermatozoides, quando estocados no ducto deferente ou no oviduto da fêmea.

Palavras-chave: Reprodução, coral-verdadeira, quiescência, estocagem, histoquímica.

INTRODUÇÃO

O ciclo reprodutivo dos machos pode ser analisado pela investigação da espermatogênese, alterações no nível de testosterona e pelas variações do segmento sexual renal ao longo do ano. Dos padrões existentes do ciclo espermatogênico, temos as classificações propostas por Volsoe (1944) e por Saint-Girons (1982) definindo quatro tipos de ciclo, sendo: Tipo I (pós-nupcial ou dissociado) no qual há um pico na produção dos espermatozoides após a época do acasalamento, geralmente na estação mais quente do ano, acontecendo então a estocagem na região do ducto deferente. Tipo II (misto) normalmente este padrão de ciclo enquadra espécies com dois períodos de cópula no ano, a síntese dos espermatozoides aumenta no final da primavera, ocorrendo um período de quiescência na estação do inverno e reinício de produção com o aumento das temperaturas no ano seguinte. Tipo III (pré-nupcial ou associado) o aumento na síntese dos espermatozoides antecede a época de cópula e a máxima produção ocorre na própria época do acasalamento. Tipo IV (acíclico) a síntese dos espermatozoides é contínua, ou seja, não há grandes variações ao longo do ano.

O dimorfismo sexual está presente em muitas espécies de serpentes e essas diferenças podem aparecer como alterações de proporções anatômicas, coloração e no formato das escamas (PIZZATO et al., 2007), porém nas serpentes o dimorfismo mais comum é o de tamanho ou comprimento (SHINE, 1994; GREENE, 1997; RIVAS e BURGHARDT, 2001).

Almeida-Santos et al.(2006) descreveu, para *M. corallinus*, a existência de sincronismo dentro dos sexos e uma coordenação do ciclo reprodutivo do macho (pós-nupcial) e da fêmea (pré-nupcial); porém os próprios autores afirmam que os dados mais aprofundados do ciclo são necessários, devido à alta diversidade de padrões de ciclo dentro do grupo Elapidae, possivelmente por existir regiões climaticamente diferentes nos locais de distribuição deste grupo.

Nos machos, muitos trabalhos utilizam como parâmetro para definir o ciclo, o aumento do volume testicular, comparando entre as estações do ano para inferir a espermatogênese, porém apenas esse tipo de análise pode levar a conclusões erradas em relação ao ciclo (ROJAS et al., 2013; ALMEIDA-SANTOS et al., 2014)

as análises histológicas são imprescindíveis para ter-se a exatidão na correlação e confirmação das etapas da espermatogênese (MATHIES, 2011; MUNIZ-DA-SILVA, 2013; ALMEIDA-SANTOS et al., 2014).

Em Squamata, simultaneamente à espermatogênese ocorre uma modificação nos néfrons do rim, essa modificação é uma hipertrofia das células que compõem o túbulo contorcido distal, nomeado de segmento sexual renal (SSR), no qual há produção de grânulos de secreção; geralmente esse período é concomitante a espermatogênese (ROJAS e ALMEIDA-SANTOS, 2008; GIST, 2011; MUNIZ-DA-SILVA, 2013).

Foram formuladas muitas hipóteses das funções destes grânulos sintetizados pelo SSR, como a participação na produção de feromônio, de ser um integrante na composição do sêmen para manter os espermatozoides vivos no oviduto da fêmea (FOX, 1977; SEVER et al., 2008; GIST, 2011); ter envolvimento em comportamento de corte, guarda copulatória e combate (ALMEIDA-SANTOS et al., 1999; ROJAS e ALMEIDA-SANTOS, 2008).

Foi descrito por Devine (1975) como possível função dos grânulos secretados pelo SSR, a formação de um *plug* copulatório em *Thamnophis* sp., uma massa gelatinosa que impediria a passagem de outros espermatozoides garantindo, assim, a fecundação do primeiro macho que copulou com a fêmea (ROJAS e ALMEIDA-SANTOS, 2008; GIST, 2011).

Na região distal do ducto deferente há uma região nomeada de *ampulla*, inicialmente descrita em mamíferos, nesta região aconteceria o termino da maturação dos espermatozoides, estocagem e em certas situações de fagocitose. Sever (2004) analisando os machos de *Seminatrix pygaea*, observou diferenças em relação a conformação e altura do epitélio entre a região proximal e distal do ducto deferente; observando então que a estrutura na região distal do ducto deferente era muito semelhante *ampulla*, encontrada nos mamíferos.

Existem trabalhos recentes que descrevem a presença da *ampulla* em serpentes tropicais, que estocavam os espermatozoides. A espécie *Sibynomorphus mikanii*, por exemplo, exhibe a estrutura da *ampulla* e esta possui a atividade secretora, constatado por técnicas de histoquímica (ROJAS et al., 2013). Porém nem das as espécies apresentam esta atividade secretora, como observado em *Bothrops Erythromelas* (Barros et al., 2014).

Desta forma, o intuito deste trabalho foi investigar o ciclo reprodutivo dos machos de *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis*, analisando a época da espermatogênese, hipertrofia do segmento sexual renal e da presença da estratégia de estocagem. Utilizando dados histológicos associando a biometria das espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 81 espécimes de *Micrurus corallinus* (sendo 41 fêmeas e 40 machos) e 43 espécimes de *Micrurus frontalis* (18 machos e 25 fêmeas), fixados em formol e álcool 70%, provenientes de coleções biológicas como: Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas (ZUEC), do Museu de História Natural Capão da Imbuía (MHNCI); Coleção Biológica do Instituto Butantan (IB), do Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ); do Museu de Ciências Naturais (MCNR) da Pontífice Universidade Católica de Minas Gerais; Museu Biológico da Universidade Federal de Santa Catarina; e da Coleção Biológica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS).

O número amostral total para análise dos espécimes adultos de *M. corallinus* e de *M. frontalis*, foram separados conforme o sexo e a data de coleta, pelas quatro estações do ano (Tabela 1).

Tabela 1. Número de espécimes mínimo para análise comparativa da biometria de cada espécie. O número amostral da histologia está contido no número de exemplares da biometria, ou seja, apenas de alguns indivíduos foram coletadas amostras teciduais para histologia.

Número de espécimes	Primavera	Verão	Outono	Inverno	Total
Biometria machos	10	10	10	10	40
Histologia machos	5	5	5	5	20
Biometria fêmeas	10	10	10	10	40

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente foi feita a descrição das características morfológicas do sistema reprodutor masculino das duas espécies. Para morfometria, foram realizadas algumas medições da anatomia externa de espécimes coletados ao longo das quatro estações do ano, para se analisar o dimorfismo sexual. Internamente, foram medidas algumas porções do aparelho reprodutor, das vias genitais dos machos (cf., ALMEIDA-SANTOS et al., 2006; BARROS et al., 2012). Com esses dados é possível averiguar se há variações no diâmetro do ducto deferente, volume do rim e do testículo entre as quatro estações do ano.

A histologia do testículo permitiu analisar o estágio da espermatogênese no qual os indivíduos se encontravam. A técnica de histologia e no rim permitiu investigar o estágio de hipertrofia no qual se encontrava o segmento sexual renal (SSR) durante o ciclo reprodutivo, observando sua relação com a o período da espermatogênese. As estratégias reprodutivas foram amostradas pela análise histológica, da ocorrência de estocagem de espermatozoides no ducto deferente no macho.

BIOMETRIA E DISSECÇÃO DOS ESPÉCIMES

Para a biometria externa foram coletadas as seguintes medidas: comprimento rostro-cloacal (Crc); comprimento da cauda (Ccau) e comprimento da cabeça (Ccab), em milímetros, com auxílio de uma fita métrica ou paquímetro digital, circunferência (mm) e o valor de massa.

Com uma incisão longitudinal ventral a partir da cloaca, até um terço do comprimento total, os seguintes dados foram coletados para biometria interna: massa de cada órgão, comprimento (a), largura (b) e espessura (c) dos testículos e dos rins; largura da região distal dos ductos deferentes direito e esquerdo, em milímetros. Quando os valores obtidos para os dois testículos diferirem mais que três milímetros, os dados do espécime não foram utilizados. Para o cálculo do volume testicular, foi utilizada a formula de volume elipsoide, dado em milímetros cúbicos: $\frac{4}{3}\pi\left(\frac{a}{2}\right)\left(\frac{b}{2}\right)\left(\frac{c}{2}\right)$, (cf., PLEGUEZUELOS e FERICHE, 1999).

Como método comparativo para a obtenção do volume foi utilizado o método do volume pelo deslocamento do líquido em uma proveta milimétrica de 10 mL, os órgãos dos machos testículo e rim são imersos em líquido para obtenção do volume (cf., ARAÚJO et al., 2014).

COLETA DE TECIDO E HISTOLOGIA

Os exemplares de cada espécie tiveram algumas regiões do sistema reprodutor coletadas para histologia, cada fragmento tecidual media aproximadamente 2 cm cada, os locais coletados foram: infundíbulo posterior, oviduto anterior e oviduto posterior, apenas do lado direito (Figura 4 e 5). As amostras coletadas foram imersas em álcool a 70% e armazenadas em cassetes histológicos para preservação até o preparo histológico.

O material passou por um processo de desidratação em série alcoólica crescente, por uma hora cada. Após a desidratação, os tecidos foram diafanizados em xilol por uma hora e incluídos em parafina. Os cortes realizados foram feitos com a espessura de 5 micrômetros, a coloração básica utilizada para análise foi a de hematoxilina e eosina (H/E), de acordo com o protocolo utilizado no laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LABIOCEL) e disponibilizado na internet (LABIOCEL, 2002). Outras colorações também foram utilizadas para análise morfológica do oviduto, como o Tricrômico de Gômori e Tricrômico de Touchman (cf., Junqueira e Junqueira, 1983). Ambas as colorações deixam as camadas teciduais com colorações diferentes, promovendo assim uma maior delimitação entre estas. Além de evidenciar a região epitelial, as glândulas no tecido conjuntivo ficaram realçadas.

HISTOQUIMICA

Após a realização dos cortes algumas lâminas foram selecionadas para a análise histoquímica, as colorações utilizadas foram o Azul de Bromofenol (BB) para observar reações histoquímicas de natureza proteica, Alcian Blue (AB) para mucopolissacarídeos ácidos e Ácido Periódico–*Schiff* (PAS) na determinação de mucopolissacarídeos neutros. A contra coloração utilizada foi a hematoxilina. Os

protocolos utilizados seguiram como bases Junqueira e Junqueira (1983), entretanto estes foram adaptados em relação a duração em cada corante.

FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Primeiramente todos os dados foram avaliados quanto à normalidade por *Kolmogorov – Smirnov* (teste K-S), avaliando se os dados seguem padrão paramétrico ou não paramétrico. Assim sendo, as medidas do comprimento rostro-cloacal (Crc), Comprimento da cauda (Ccau) e Comprimento da cabeça (Ccab) foram analisadas pelos testes ANOVA, “t” *student*.

Para a comparação dos dados de volume do rim, testículo e largura do Ducto Deferente entre os machos coletados em cada estação do ano, foram utilizados os testes: Análise de Variância (ANOVA) complementado pelo teste de *Tukey* par-a-par. A estatística foi analisada com o pacote estatísticos *Action* do Office Excel 2013, além dos softwares Minitab 1.7 *statistic* e *Paleontological Statistics* (PAST), com nível de significância igual a 95%, ($p < 0,05$).

RESULTADOS

DIMORFISMO SEXUAL: Dados da biometria externa

As medidas do comprimento rostro-cloacal, cauda e cabeça foram comparadas entre machos e fêmeas da mesma espécie (Tabelas 2 e 4) e posteriormente entre as espécies. Inicialmente os dados passaram pelo teste de aderência à normalidade *Kolmogorov-smirnov*, apenas os valores do Ccab de *M. corallinus* tiveram que passar pela transformados do método Logarítmico (base 10), para obter a normalidade de distribuição dos dados. Sendo a distribuição dos dados paramétrica, em ambas as espécies, foram feitos os testes ANOVA e *t student*.

BIOMETRIA EXTERNA *MICRURUS CORALLINUS*

A análise da biometria comparativa, entre os sexos, analisou as medidas do comprimento rostro-cloacal, cabeça e cauda (Tabela 2).

Tabela 2. Médias com os respectivos desvios padrão (s) e valores mínimo e máximo (mín-máx) e dos comprimentos: rostro-caudal (Crc), da cauda (Ccau) e da cabeça (Cca) de machos e fêmeas de *Micrurus corallinus*. N = número amostral.

Sexo	Crc $\pm$ s (min-máx)	p	Ccab $\pm$ s (min-máx)	p	Ccau $\pm$ s (min-máx)	p
F N= 40	674,2 $\pm$ 116,1 (503-930)	p<<0,01*	19,2 $\pm$ 3,3 (12,3-25,5)	p=0,039*	64,1 $\pm$ 11,5 (44,5-91,1)	p<<0,001*
M N= 41	584,6 $\pm$ 89,1 (460-760)		17,6 $\pm$ 2,3 (13,3-22,1)		90,3 $\pm$ 13,9 (69,4-121,5)	

Na comparação do comprimento rostro-cloacal (Crc) entre machos e fêmeas, por ANOVA, foram obtidos os valores de $F = 25,62$ e $p << 0,05$. Pelo teste *t student*, o resultado foi de $t = 5,04$ e o valor de $p = 3,2E-06$. Desta forma, ambos os testes indicam uma diferença significativa da média do Crc das fêmeas, no caso maior, comparado com o dos machos (Figura 1).

Os dados do comprimento da cabeça (Ccab) apresentaram distribuição paramétrica após passarem pela transformação logarítmica (base 10), por ANOVA o valor de $F = 4,4$ com (F -crítico = 3,98) o resultado de $p = 0,039$; pelo teste *t student* como o valor de $p = 0,053 > 0,05$ e com o valor de $t = 1,98$ (t -crítico = 2,01; bi-caudal). Desta forma, como houve uma pequena diferença, de resultado na comparação dos testes. Foi então realizado o teste de *Tukey*, obtendo-se o valor de $p = 0,0398$; confirmando a diferença significativa, logo a média do Ccab das fêmeas é significativamente maior que o dos machos (Figura 3).

Os valores do comprimento da cauda (Ccau) por ANOVA foram de $F = 84,32$; sendo este muito maior que o F crítico e o valor de $p << 0,0001$; por *t student* o valor de $p << 0,0001$; logo ambos os testes mostram que há uma diferença significativa do comprimento da cauda, com o macho possuindo uma cauda de maior comprimento (Figura 5).

CORRELAÇÃO E PROPORÇÃO

As medidas do comprimento da cabeça e da cauda foram correlacionadas com o comprimento rostro-cloacal, em ambos os sexos.

Na espécie *Micrurus corallinus* o coeficiente de correlação de Pearson indicou, para todas as comparações, relação positiva. O coeficiente de determinação mostrou uma forte relação entre as medidas (Tabela 3).

Tabela 3. Dados do Comprimento rostro-cloacal (Crc) correlacionados com o comprimento da cabeça (Ccab) e Comprimento da cauda (Ccau) em *Micrurus corallinus*.

Correlação com Crc				
Sexo e medida	F Ccab	F Ccau	M Ccab	M Ccau
Coef. Determinação R ²	0,70	0,83	0,64	0,74

Na análise da proporção do Ccab e Ccau em relação ao Crc, temos que a média do Ccab das fêmeas representa em média 2,95% do corpo, enquanto que para os machos essa medida representa 3,21%.

Na comparação do Ccau, a cauda representa em média 9,12% do corpo das fêmeas e nos machos essa medida representa aproximadamente 16,2%. Ou seja, mesmo que os machos possuam um Crc menor que o das fêmeas, proporcionalmente o comprimento da cabeça e da cauda são maiores.

BIOMETRIA EXTERNA DE *MICRURUS FRONTALIS*

A análise da biometria comparativa, entre os sexos, analisou as medidas do comprimento rostro-cloacal, cabeça e cauda (Tabela 4).

Tabela 4 Médias com os respectivos desvios padrão (s) e valores mínimo e máximo (mín-máx) e dos comprimentos: rostro-caudal (Crc), da cauda (Ccau) e da cabeça (Cca) de machos e fêmeas de *Micrurus frontalis*. N = número amostral.

Sexo	Crc ± s		p	Ccab ± s		p	Ccau ± s		p
	(min-máx)			(min-máx)			(min-máx)		
F	739,7 ± 104,2		p<0,05	20,6 ± 2,5		p<0,05	40,4 ± 5,1		p<0,01*
N= 18	(552-905)			(17,2-27,1)			(30,5-49,2)		
M	864,4 ± 186,5			23,1 ± 4,3			52,0 ± 10,5		
N= 25	(615-1330)			(15,7-31,4)			(34,9-76,1)		

O resultado da comparação do Crc, por ANOVA, foi de $F = 6,53$ (F -crítico = 4,07) e o valor de $p = 0,014$; pelo teste *t student* o valor de $p = 0,008$; existindo uma diferença significativa do comprimento Crc entre machos e fêmeas (Figura 2).

Na comparação do Ccab os valores, por ANOVA $F = 4,53$ (F -crítico = 4,09) e $p = 0,039$; pelo teste *t student* obteve-se $p = 0,031$. Ambos os testes mostraram o valor de $p < 0,05$ resultando em uma diferença significativa da média do comprimento da cabeça dos machos, no caso maior, em relação a das fêmeas (Figura 4). Da mesma forma o resultado Ccau mostrou uma diferença significativa, por ANOVA os valores encontrados foram $F = 20,41$ e $p < 0,01$; por *t student* o resultado de $p < 0,01$ (Figura 6).

CORRELAÇÃO E PROPORÇÃO

Os dados referentes ao comprimento da cabeça e da cauda foram correlacionados como o comprimento da rostro-cloacal, em todas as análises houve uma correlação positiva, posteriormente foi feito o cálculo do coeficiente de determinação para saber a força desta relação (Tabela 5).

Tabela 5. Dados do Comprimento rostro-cloacal (Crc) correlacionados com o comprimento da cabeça (Ccab) e comprimento da cauda (Ccau) em *Micrurus frontalis*.

Correlação com Crc				
Sexo e medida	F Ccab	F Ccau	M Ccab	M Ccau
Coef. Determinação R^2	0,42	0,80	0,44	0,81

O resultado da proporção mostrou o Ccab nas fêmeas representa 2,8% do corpo e para os machos essa relação é de 3,01%. A medida da Ccau representa em média 5,47% do corpo das fêmeas, enquanto para os machos a cauda representa 6,11 % do corpo.

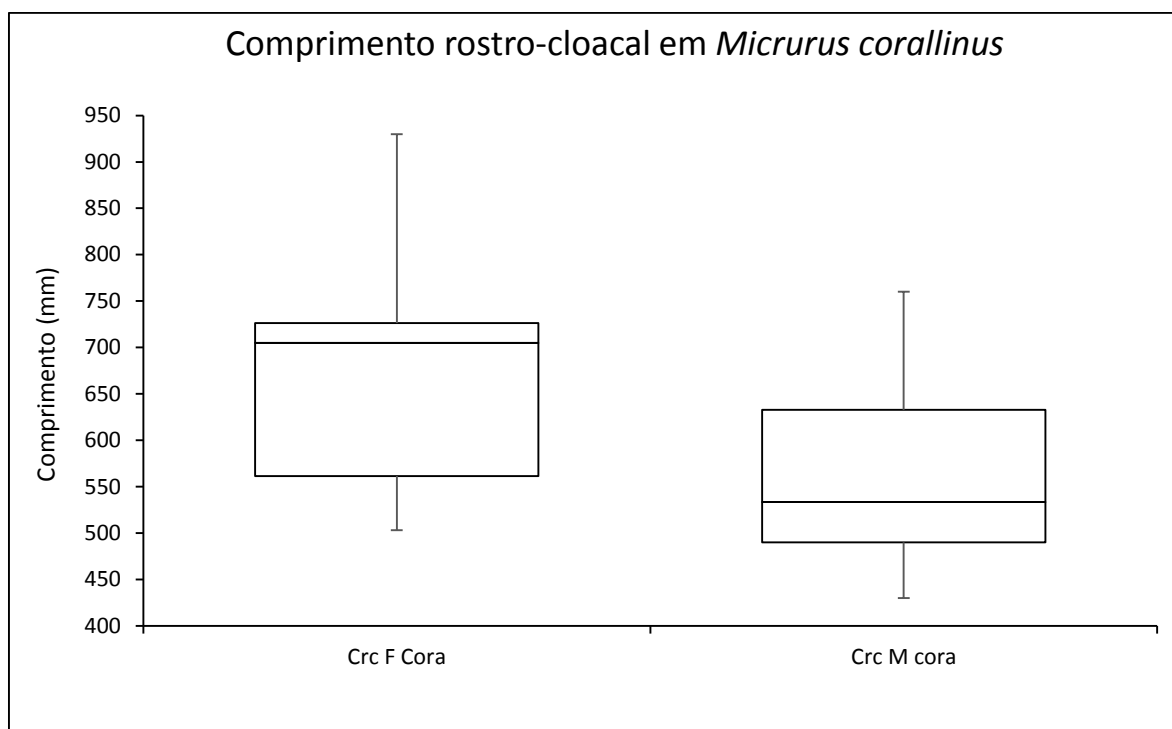


Figura 1. Gráfico Boxplot da comparação entre as médias do comprimento rostro-cloacal (Crc) de machos e fêmeas. *Micrurus corallinus*

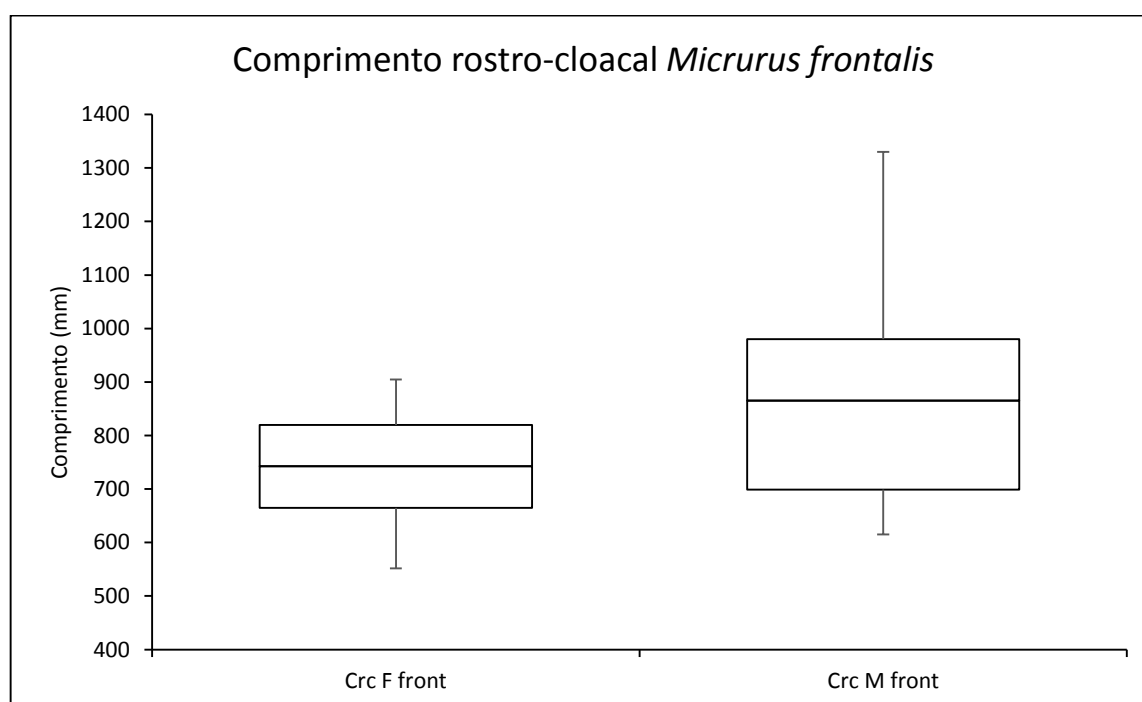


Figura 2. Gráfico Boxplot da comparação entre as médias do comprimento rostro-cloacal (Crc) de machos e fêmeas. *Micrurus frontalis*

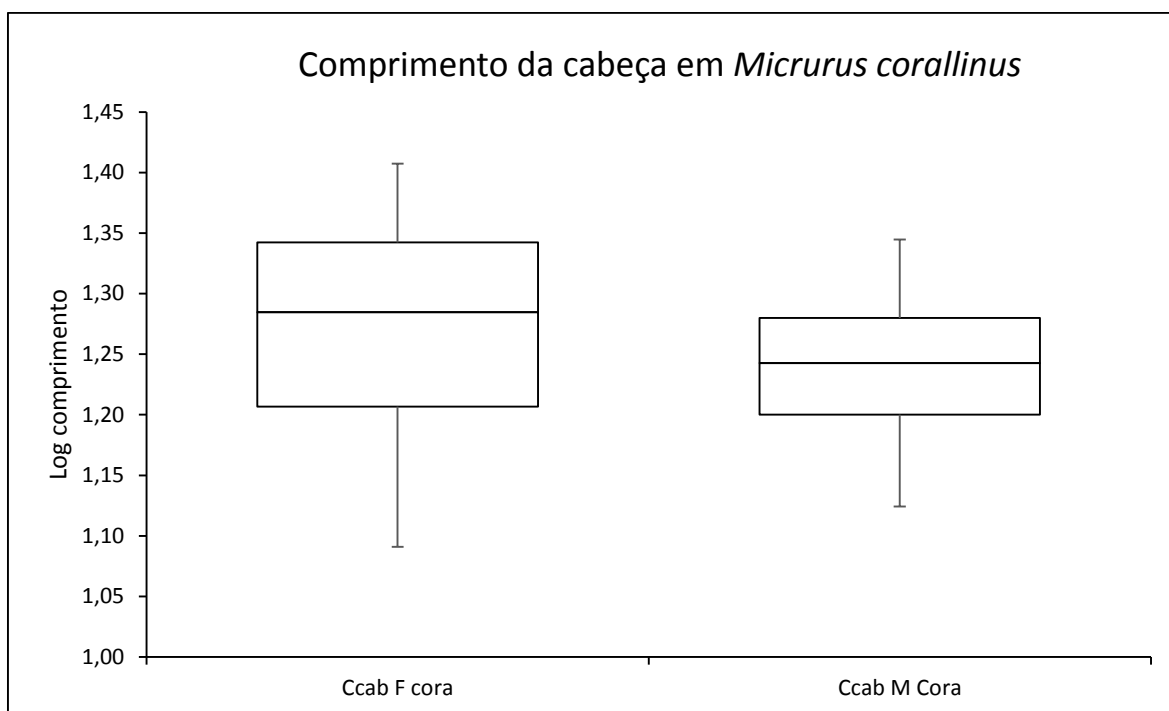


Figura 3. Gráfico Boxplot da comparação entre as médias de do comprimento da cabeça (Ccab) de machos e fêmeas. *Micrurus corallinus*.

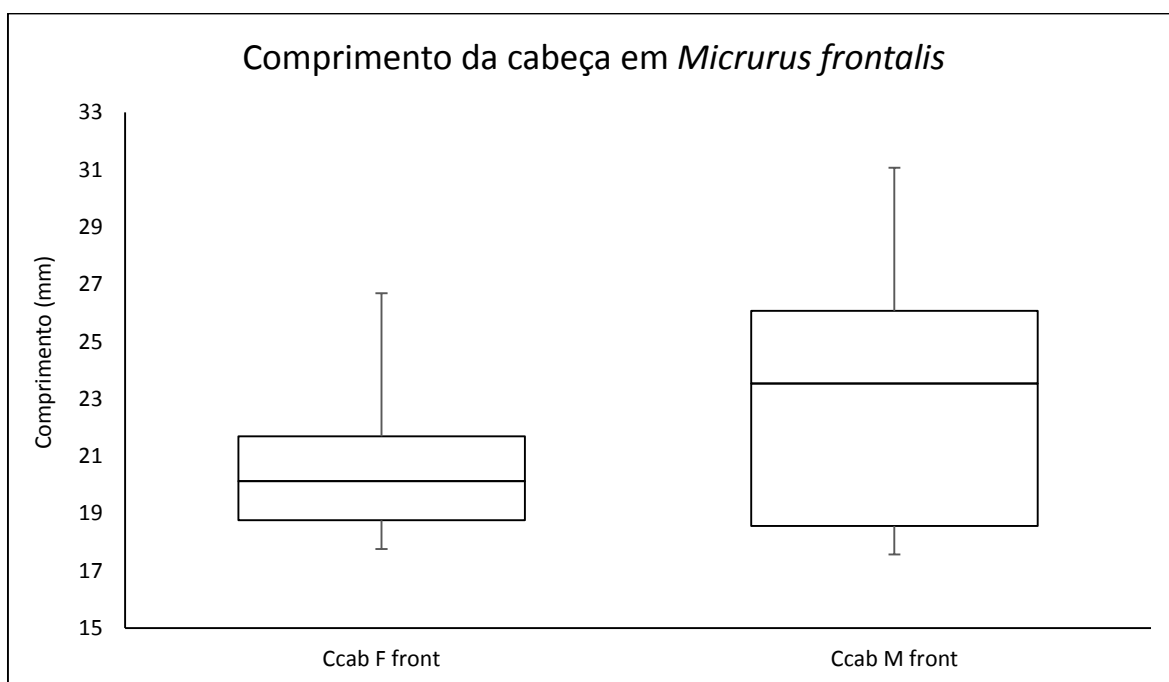


Figura 4. Gráfico Boxplot da comparação entre as médias de do comprimento da cabeça (Ccab) de machos e fêmeas. *Micrurus frontalis*.

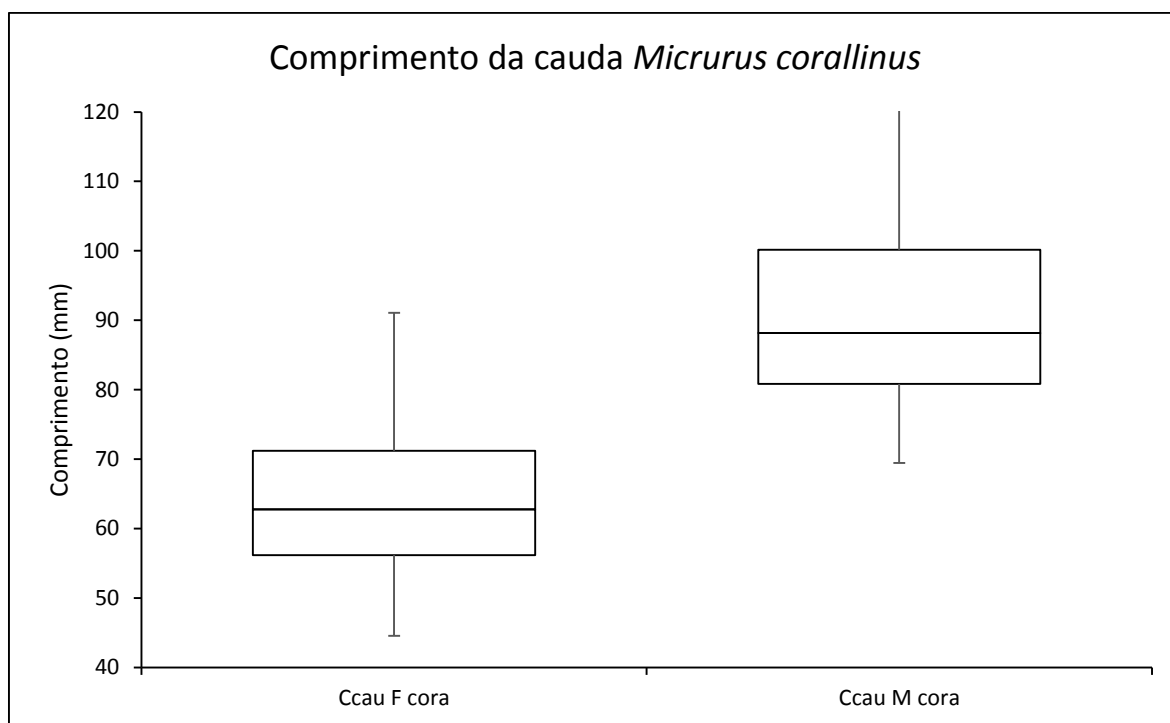


Figura 5. Gráfico Boxplot da comparação entre as médias de do comprimento da cauda (Ccau) de machos e fêmeas. *Micrurus corallinus*

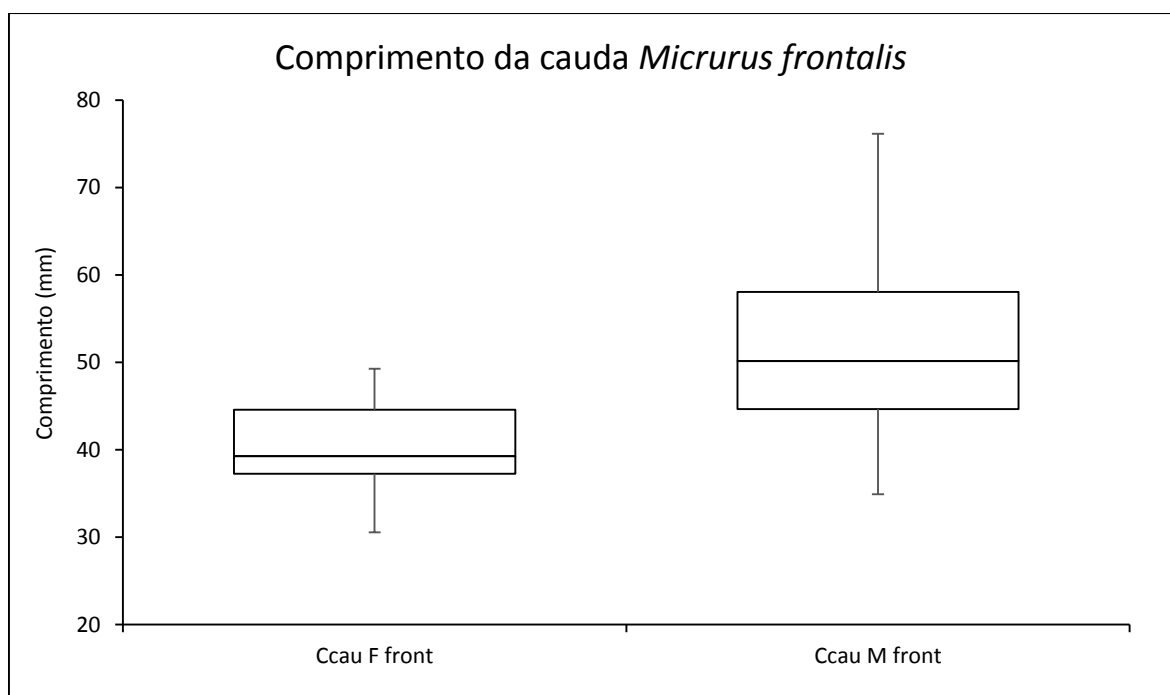


Figura 6. Gráfico Boxplot da comparação entre as médias de do comprimento da cauda (Ccau) de machos e fêmeas. *Micrurus frontalis*

SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

O sistema reprodutor dos machos, para ambas as espécies, possui a arquitetura geralmente assimétrica, sendo o lado direito mais cranial que o esquerdo (Figura 7). Cada lado é formado por um testículo envolto pela túnica albugínea, internamente temos os túbulos seminíferos, onde os espermatozoides são produzidos, ao longo de seu prolongamento os túbulos passam por uma junção e afunilamento formando os ductos eferentes, posteriormente temos a região do ducto epididimal, seguido pelo ducto deferente (que passa ao lado do rim) e ligando-se ao órgão copulatório o hemipênis.

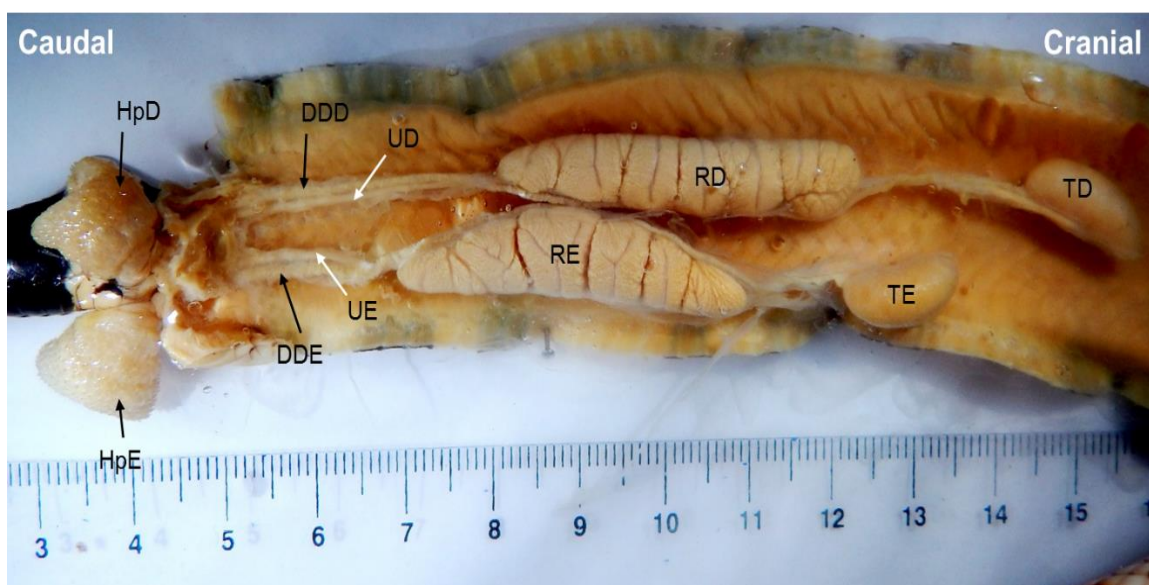


Figura 7. Sistema reprodutor de macho de *Micrurus corallinus*. Testículo direito (TD) e esquerdo (TE); rim direito (RD) e esquerdo (RE); ducto deferente direito (DDD) e esquerdo (DDE); ureter direito (UD) e esquerdo (UE); hemipênis direito (HpD) e esquerdo (HpE). As setas em verde indicam a extensão do ducto deferente proximal e distal.

BIOMETRIA INTERNA: CORRELAÇÃO

Os dados do volume do rim e do testículo foram correlacionados com o comprimento rostro-cloacal (Tabela 6).

Tabela 6. Dados do Comprimento rostro-cloacal (Crc) correlacionados com o Volume do testículo direito (Vol. TD), volume do testículo esquerdo (Vol. TE), volume total do testículo (Vol.TTot), volume rim direito (Vol.RD), volume rim esquerdo (Vol.RE), volume total do rim (Vol.RTot)

Correlação volume com Crc						
<i>Micrurus corallinus</i>	Vol. TD	Vol. TE	Vol. TTot	Vol. RD	Vol. RE	Vol. RTot
Coef. Correlação R	0,583	0,515	0,559	0,644	0,626	0,613
Coef. Determinação R ²	0,340	0,265	0,312	0,415	0,392	0,376

Os resultados indicam que a correlação entre essas duas medidas é positiva, porém em todos os casos essa relação é fraca ou moderada. Consequentemente a relação entre essas duas medidas não deve ser considerada.

VOLUME DO TESTÍCULO ENTRE AS ESTAÇÕES.

O volume do testículo foi comparado somando-se o lado direito com esquerdo, desta forma obtiveram-se os resultados. Por ANOVA *one-way* o valor de $p=0,07$ com $F=2,582$ (F crítico $=2,901$), ou seja, não houve diferença significativa na variação dos volumes conforme as estações (Figura 8).

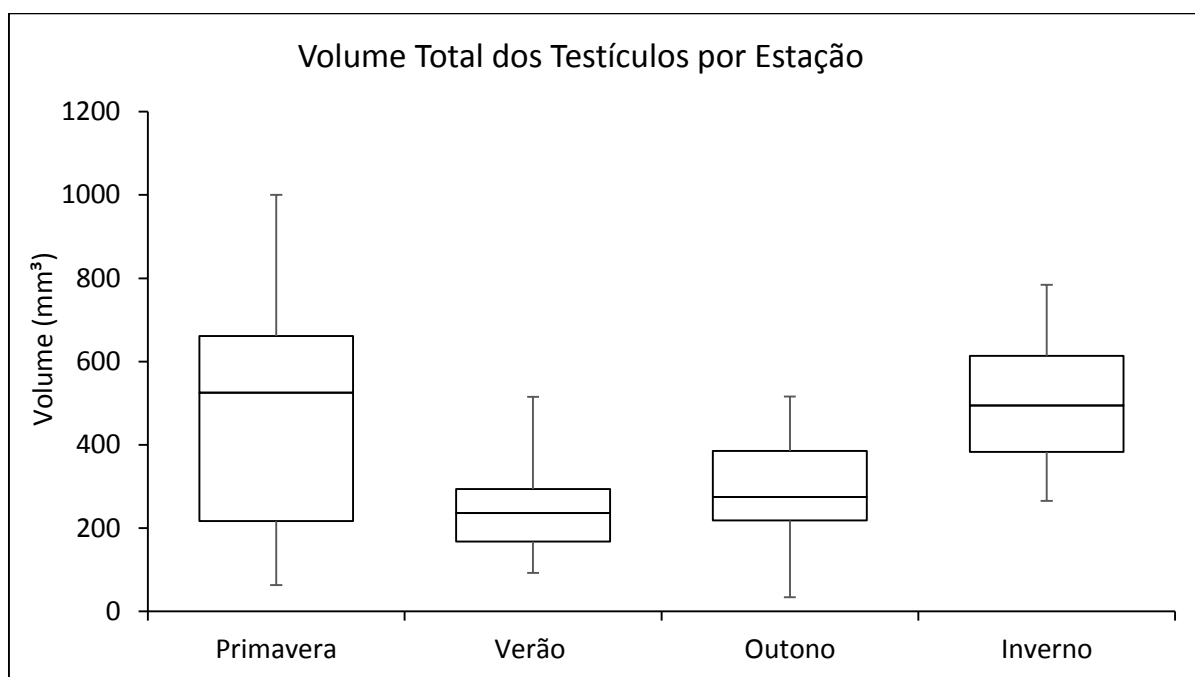


Figura 8. Gráfico Boxplot comparando a variação dos volumes do testículo dos espécimes de *Micrurus corallinus* pelas estações do ano.

VOLUME DOS RINS ENTRE AS ESTAÇÕES

O volume do rim direito foi somado com o esquerdo, de cada indivíduo, e as comparações entre as estações obteve por ANOVA *one-way* o valor de $p=0,017$ com $F=6,33$ (F crítico = 2,90), assim indicando que existe diferenças entre as médias. Pelo teste de *Tukey* par-a-par, observou-se que as diferenças existentes são as estações primavera e verão com $p=0,016$; inverno e verão com $p=0,002$ e entre inverno e outono com $p=0,042$ (Figura 9).

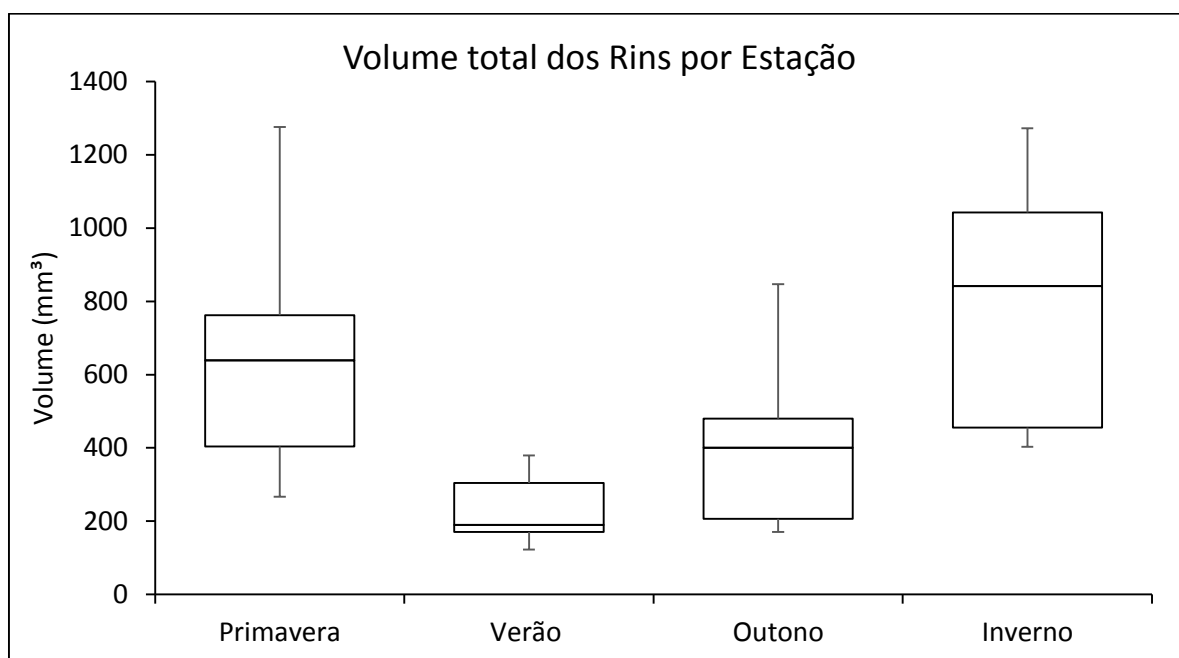


Figura 9. Gráfico Boxplot comparando a variação dos volumes do rim dos espécimes de *Micrurus corallinus* pelas estações do ano.

DIÂMETRO DO DUCTO DEFERENTE DISTAL ENTRE AS ESTAÇÕES

O diâmetro do ducto deferente, lado direito e esquerdo, foi somado e o resultado por ANOVA foi de $p= 0,181$ com $F=1,73$ (F crítico=2,91), assim indicando que não houve diferença significativa no diâmetro do ducto pelas estações de cada indivíduo (Figura 10)

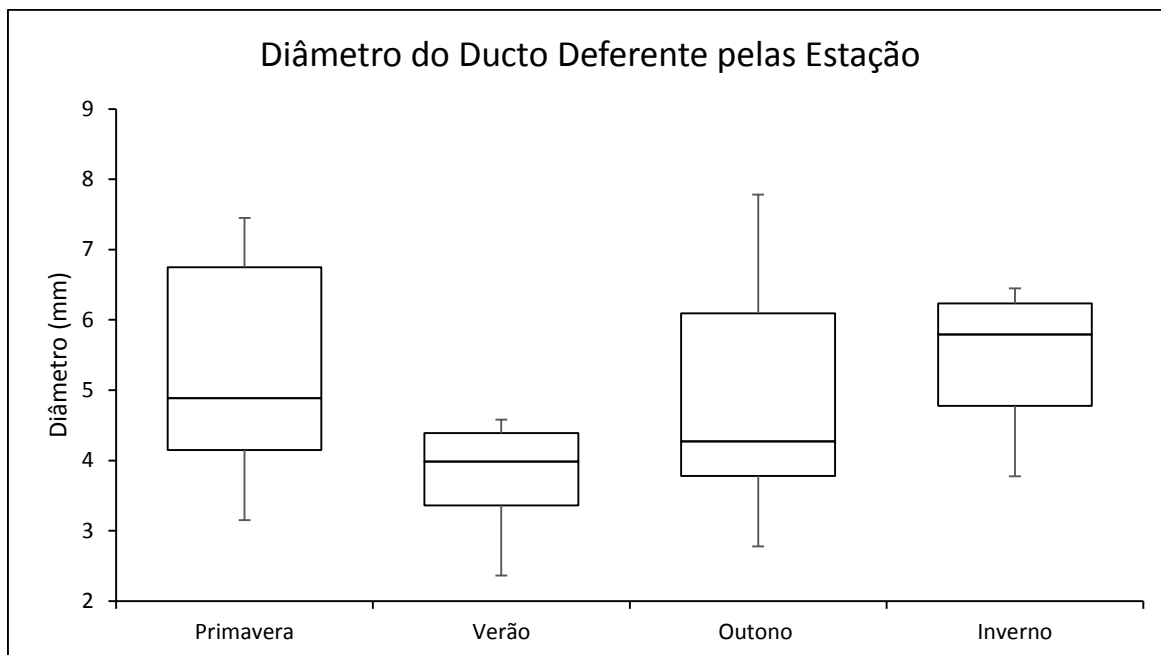


Figura 10. Gráfico Boxplot comparando a variação do diâmetro do ducto deferente dos espécimes de *Micrurus corallinus*, em cada estação do ano.

COMPARAÇÃO DOS VOLUMES: UTILIZANDO O PAQUÍMETRO E A PROVETA

O volume testicular total (lado direito somado com o esquerdo) obtido pela proveta, conforme o deslocamento do líquido, foi comparado com o volume testicular elipsoide. Estes obtiveram distribuição normal, por ANOVA os valores foram de $p=0,073$ com $F= 3,38$ (F crítico $=4,09$); pelo test *t student* o valor (bicaudal) $p= 0,075$ com $t=1,83$ (t crítico $2,03$). Na mesma comparação dos testes mas utilizando os dados do rim, temos, por ANOVA $p=0,076$ com o valor de $F=3,23$ (F crítico $= 4,09$); pelo teste *t student* o valor $p=0,076$. Desta forma, não houve uma diferença significativa entre as duas medições, para os dois órgãos testículo e rim.

HISTOLOGIA: SISTEMA REPRODUTOR DOS MACHOS DE *MICRURUS CORALLINUS*

Estação Primavera

Nesta estação os espécimes exibiram o segmento sexual renal com hipertrofia, porém com poucos grânulos e estes corados intensamente no

citoplasma do epitélio; o lúmen do SSR está praticamente ausente de secreção. O testículo mostra-se em estado de quiescência, o que é evidenciado por haver apenas espermatogônias, espermatócitos no epitélio germinativo e poucos espermatozoides na luz do túbulo seminífero. O ducto deferente distal apresenta uma concentração baixa de espermatozoides, no qual é possível observar grandes espaços no lúmen (Figura 11).

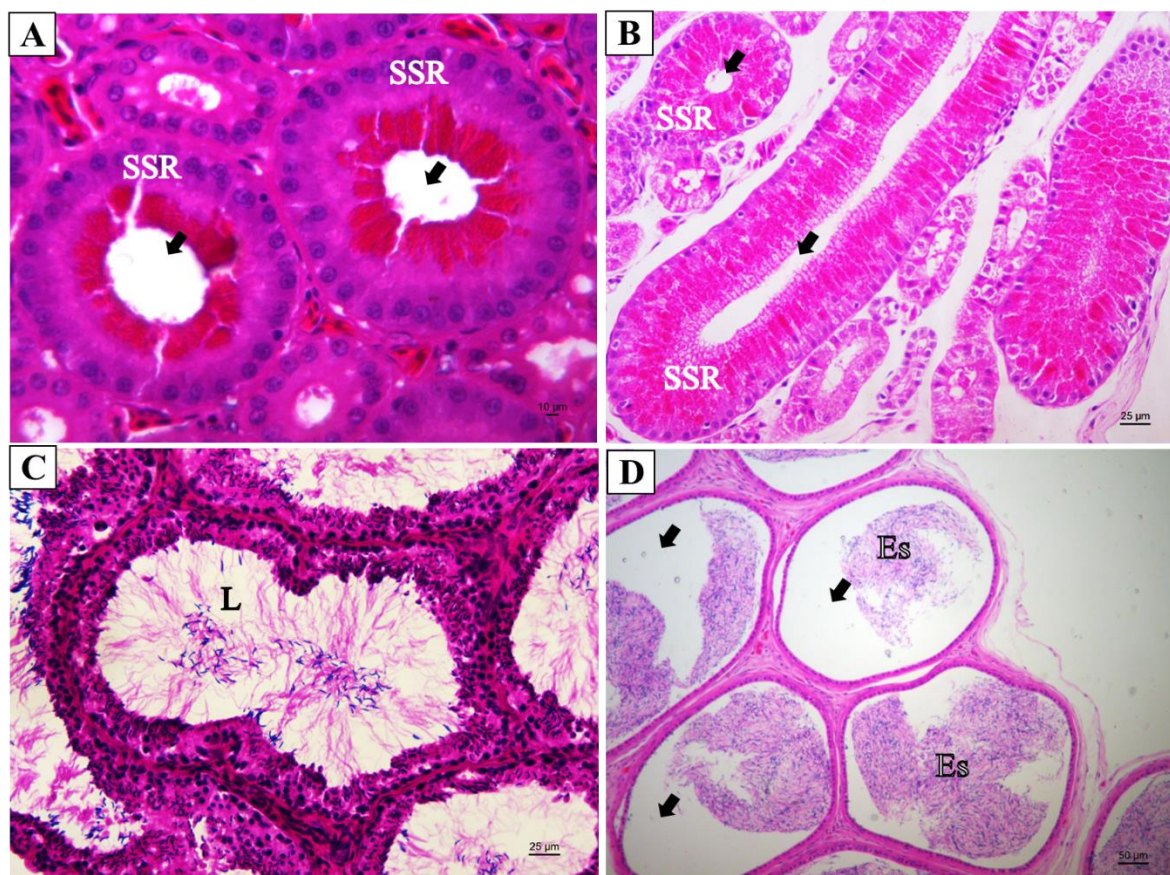


Figura 11. Cortes histológicos longitudinais do rim, testículo e ducto deferente de espécimes de *Micrurus corallinus*, coletados na primavera. Coloração H/E. **(A e B)** em detalhe o segmento sexual renal (SSR), o primeiro em vista transversal e o segundo em longitudinal, ambos mostram a hipertrofiado do SSR com poucos grânulos e com a luz do túbulo praticamente ausente de grânulos de secretados; objetiva de 40x e 10x. Escalas 10 e 25 µm **(C)** testículo em aparente período de quiescência, epitélio germinativo apenas com espermatogônias indicado pela estrela branca. Objetiva 20x. Escala 25 µm. **(D)** ducto deferente apresentando espaços em sua luz. Seta preta indica a luz do túbulo. Objetiva de 10x. **(Es)** espermatozoides. **(SSR)** segmento sexual renal.

Estação Verão

Os exemplares coletados nesta estação mostraram o SSR hipertrofiado e com uma grande quantidade de grânulos (eosinófilos) intensamente corados, porém estes apresentaram a luz do túbulo contorcido distal praticamente ausente de grânulos. O testículo mostrou o reinício do processo de espermiogênese,

comparado com a primavera, há uma quantidade maior de espermatozoides no lúmen. O ducto deferente exibe o epitélio simples pseudo-estratificado, a luz do ducto ainda possui grandes espaços sem preenchimento (Figura 12).

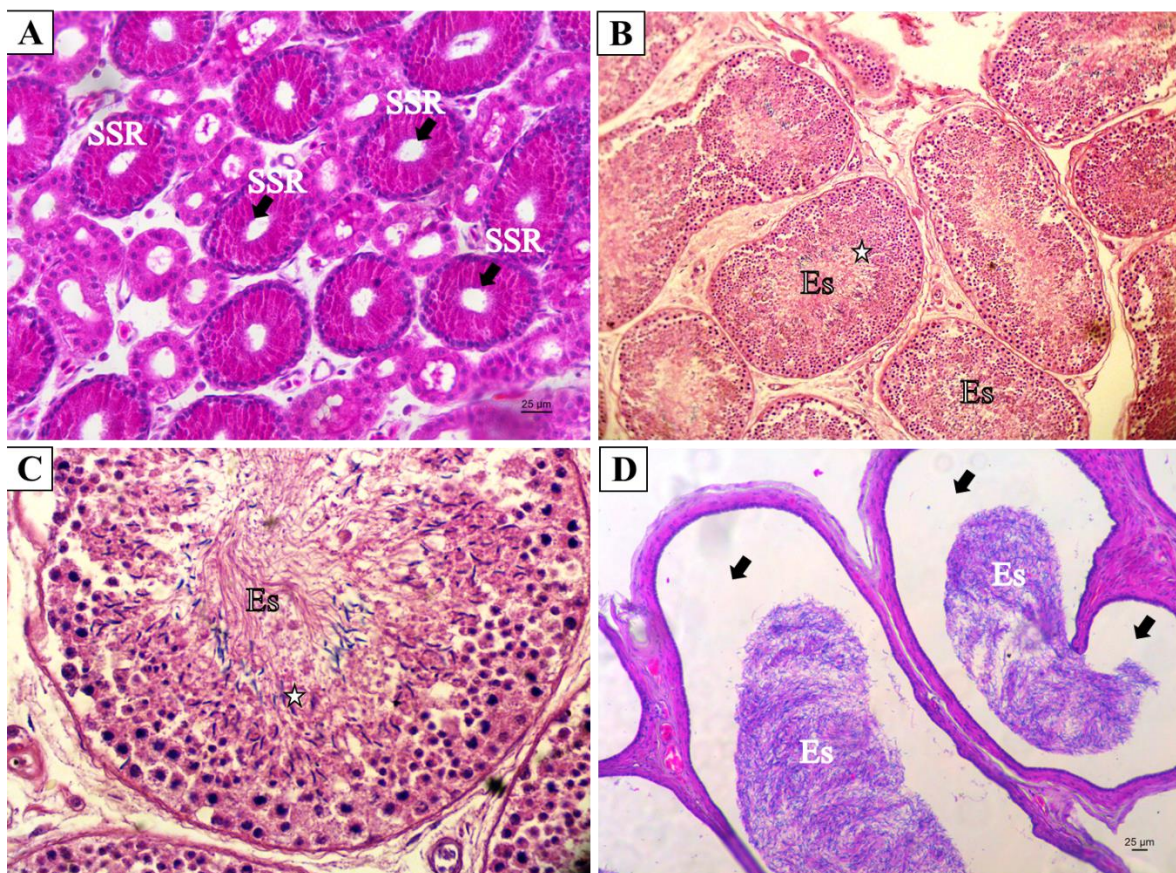


Figura 12. Cortes histológicos longitudinais do rim, testículo e ducto deferente de espécimes de *Micrurus corallinus*, coletados no verão. Coloração H/E. **(A)** segmento sexual renal (SSR) hipertrofiado com a luz do túbulo praticamente ausente de grânulos de secreção; objetiva de 10x. Escala 25 µm. **(B e C)** testículo em fase inicial da espermiogênese; estrela indicando o início da espermiogênese, objetiva 20x. **(D)** ducto deferente apresentando espaços em sua luz. Objetiva de 10x. **(Seta preta)** indica a luz do túbulo ou ducto. **(Es)** espermatozoides. **(SSR)** segmento sexual renal.

Estação Outono

Os espécimes mostraram SSR hipertrofiados com muitos grânulos no epitélio porém moderadamente corados, o lúmen apresentava a secreção destes grânulos. O testículo exibe uma quantidade maior de espermatozoides na luz do túbulo seminífero, da mesma forma o ducto deferente mostra um aumento da concentração de espermatozoides no lúmen e uma diminuição dos espaços vazios (Figura 13).

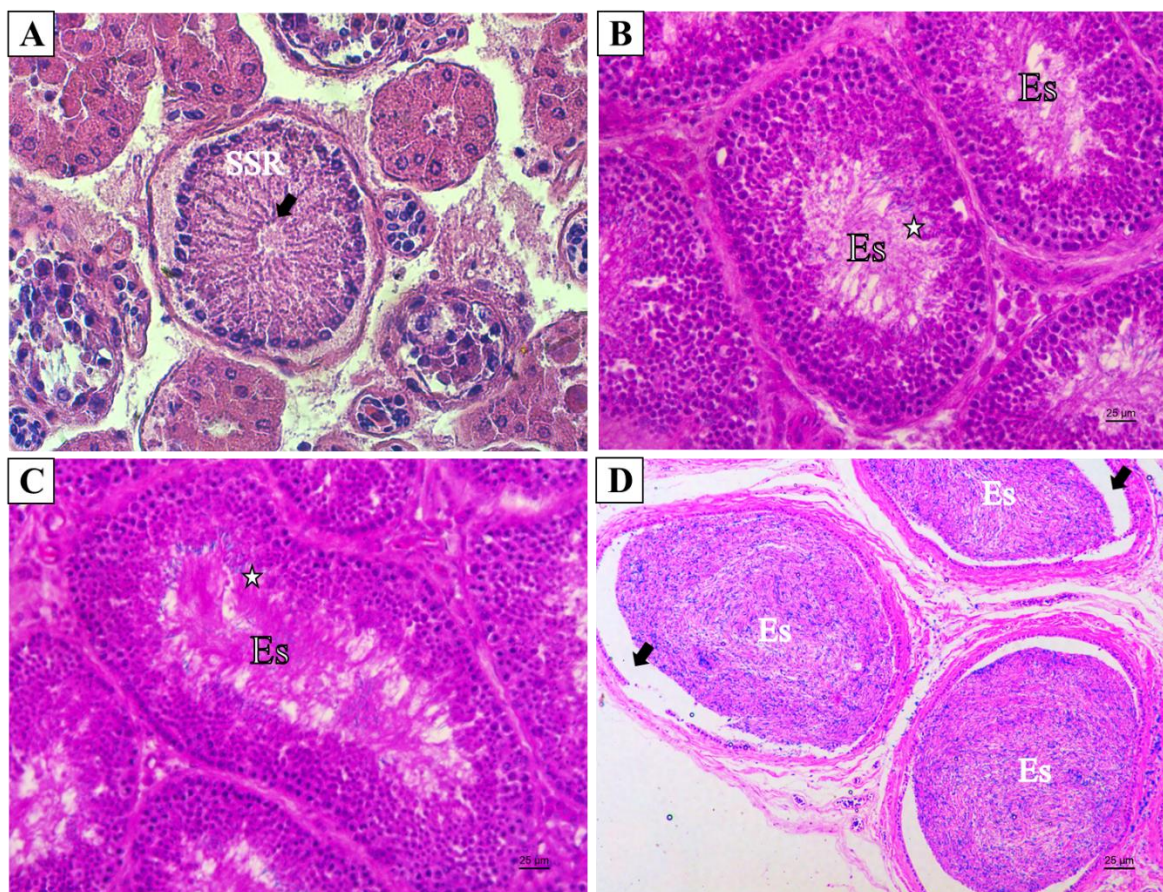


Figura 13. Cortes histológicos longitudinais do rim, testículo e ducto deferente de espécimes de *Micrurus corallinus*, coletados no outono. Coloração H/E. Escala 25 µm. **(A)** segmento sexual renal (SSR) hipertrofiado e com a luz do túbulo com grânulos secretados; objetiva de 20x. **(B e C)** testículo em fase inicial da espermiogênese; estrela indicando o início da espermiogênese, objetiva 20x. **(D)** ducto deferente apresentando espaços em sua luz. Objetiva de 10x. **(Seta preta)** indica a luz do túbulo ou ducto. **(Es)** espermatozoides. **(SSR)** segmento sexual renal.

Estação Inverno

Os exemplares exibiram o testículo com máxima produção de espermatozoides (Figura 14A, B), ao mesmo tempo é possível observar que o ducto deferente também atinge a máxima concentração de espermatozoides, ocupando quase que todo o lúmen; epitélio ainda permanece simples e cuboide (Figura 14C, D). O SSR apresenta-se hipertrofiado com máxima concentração no citoplasma, intensamente corado e com máxima secreção dos grânulos na luz do túbulo (Figura 15).

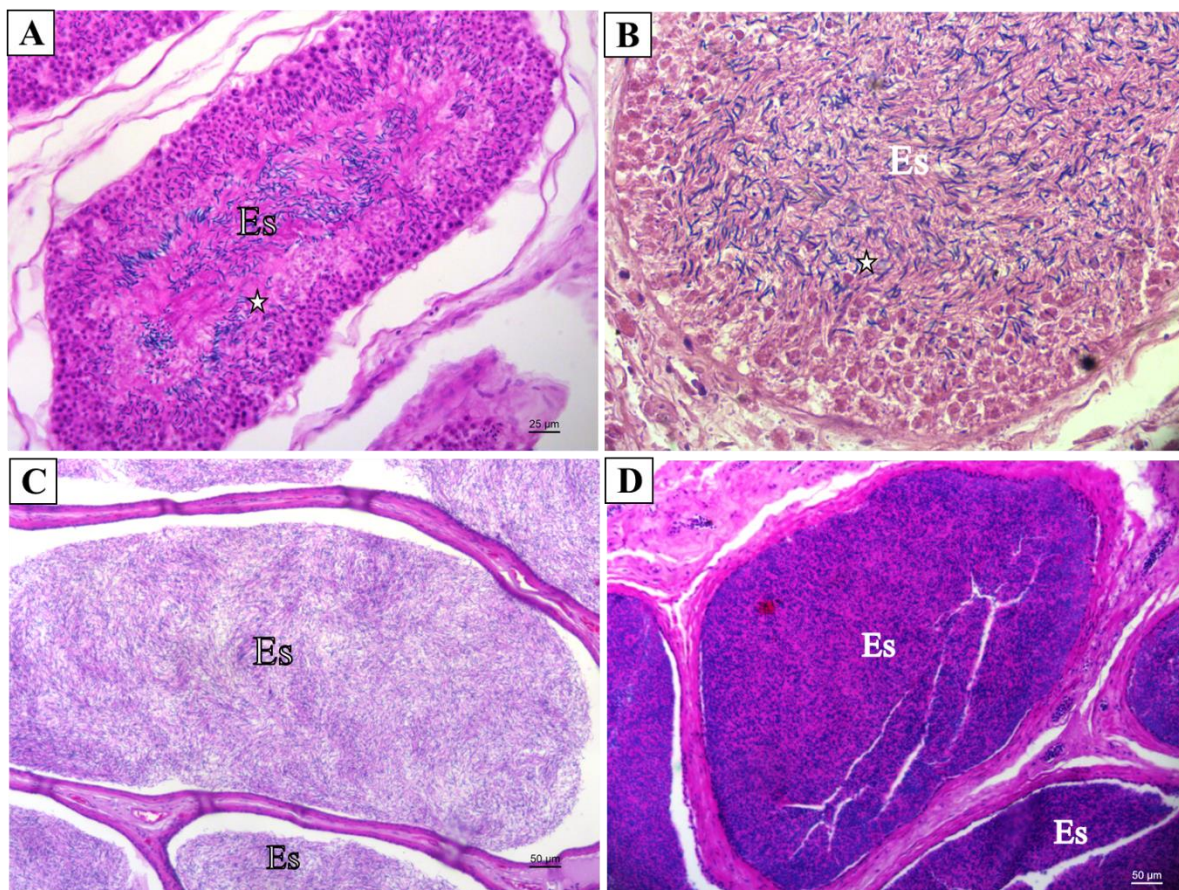


Figura 14. Cortes histológicos longitudinais do rim, testículo e ducto deferente de espécimes de *Micrurus corallinus*, coletados no inverno. Coloração H/E. Escala 25 µm. (A e B) testículo com máxima produção de espermatozoides. Objetiva 20x. (C e D) ducto deferente quase sem espaços em sua luz, máxima concentração e estocagem de espermatozoides. Objetiva de 10x. (Seta preta) indica a luz do túbulo ou ducto. (Es) espermatozoides.

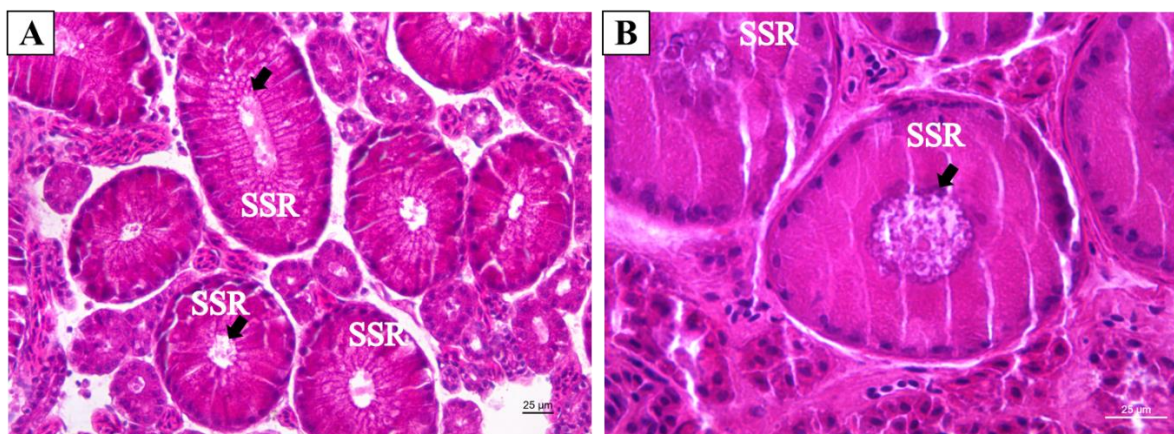


Figura 15. Cortes histológicos longitudinais do rim de espécimes de *Micrurus corallinus*, coletados no inverno. Coloração H/E. Escala 25 µm. (A e B) segmento sexual renal (SSR) hipertrofiados intensamente corados e com a luz do túbulo com grande quantidade de grânulos secretados; objetiva de 20 e 40x. (Seta preta) indica a luz do túbulo ou ducto. (SSR) segmento sexual renal.

HISTOQUÍMICA EM *MICRURUS CORALLINUS*

A coloração do ácido periódico de *Schiff*, realizada no rim dos machos de *Micrurus corallinus*, foi testada em espécimes coletados em diferentes estações do ano. O segmento sexual renal mostrou-se reativo ao PAS nas quatro estações do ano, na primavera foi observada uma diferença em relação as outras estações, há uma diminuição na quantidade de grânulos presentes no citoplasma epitelial do SSR e uma menor intensidade da coloração (Figura 16 D).

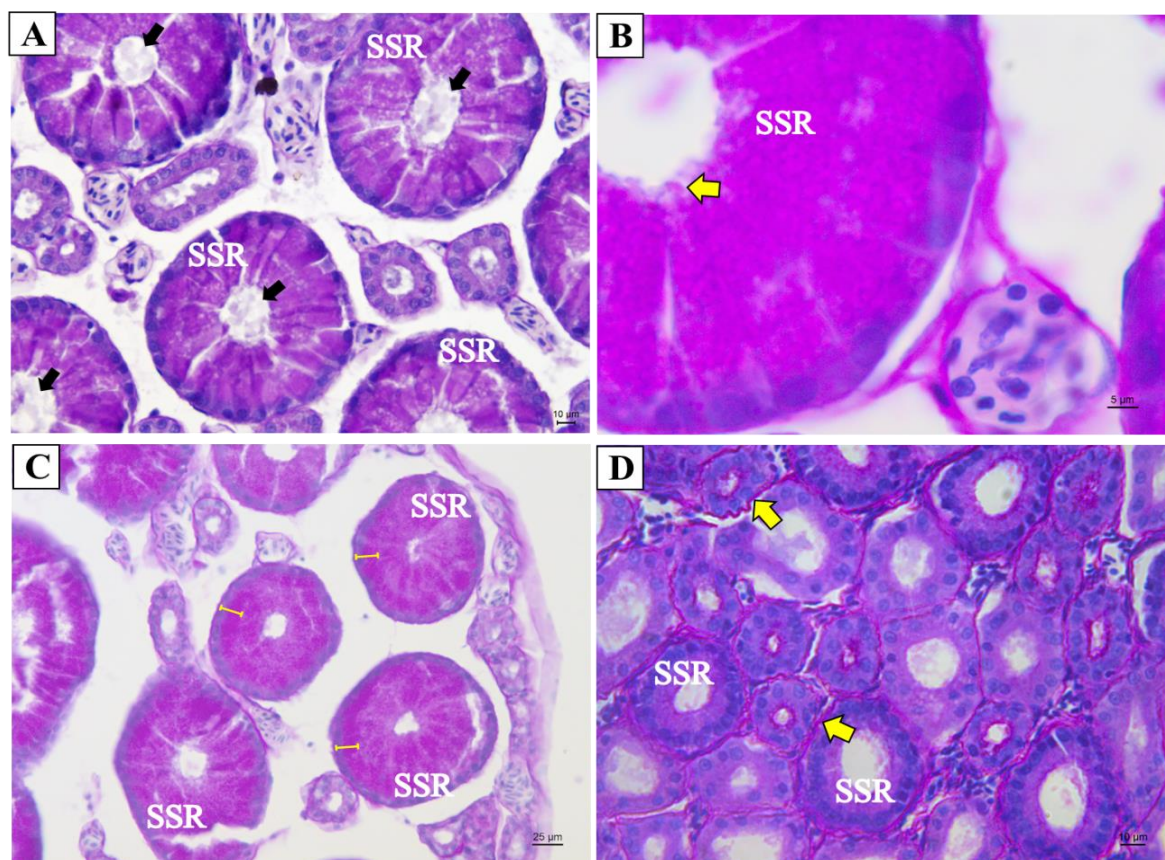


Figura 16. Cortes histológicos longitudinais do rim de espécimes de *Micrurus corallinus*, coloração ácido periódico de *Schiff*/hematoxilina. **(A)** Segmento sexual renal (SSR) espécime coletado no inverno, em detalhe a seta preta indicando grânulos presentes no lúmen; Objetiva de 40x; Escala de 10 μ m. **(B)** SSR espécime coletado no final do inverno, em detalhe grânulo reativo ao PAS; Objetiva de 100x; Escala de 5 μ m. **(C)** SSR espécime coletado na primavera, em detalhe marcação da altura do epitélio com grânulos positivos ao PAS; Objetiva de 20x; Escala de 25 μ m. **(D)** espécime coletado na primavera, grânulos pouco corados, em detalhe lâmina basal intensamente positiva ao PAS indicada pela seta em amarelo. Objetiva de 20x; Escala de 10 μ m.

HISTOLOGIA: SISTEMA REPRODUTOR DOS MACHOS DE *MICRURUS FRONTALIS*

A análise histológica não foi possível na estação do inverno porque o número amostral mínimo não foi atingido.

Estação Primavera

Na comparação dos espécimes coletados nas diferentes estações, a histologia dos testículos mostra um aumento da atividade espermiogênica na estação da primavera, o lúmen do túbulo seminífero apresenta grande concentração de espermatozoides (Figura 17A, B). Nesta estação os espécimes exibiram o SSR com hipertrofia e grânulos de secreção na luz do túbulo contorcido dista (Figura 17 C). O ducto deferente apresentou o epitélio cuboide, ausência de cristas ou dobras e alguns espaços no lúmen (Figura 17 D).

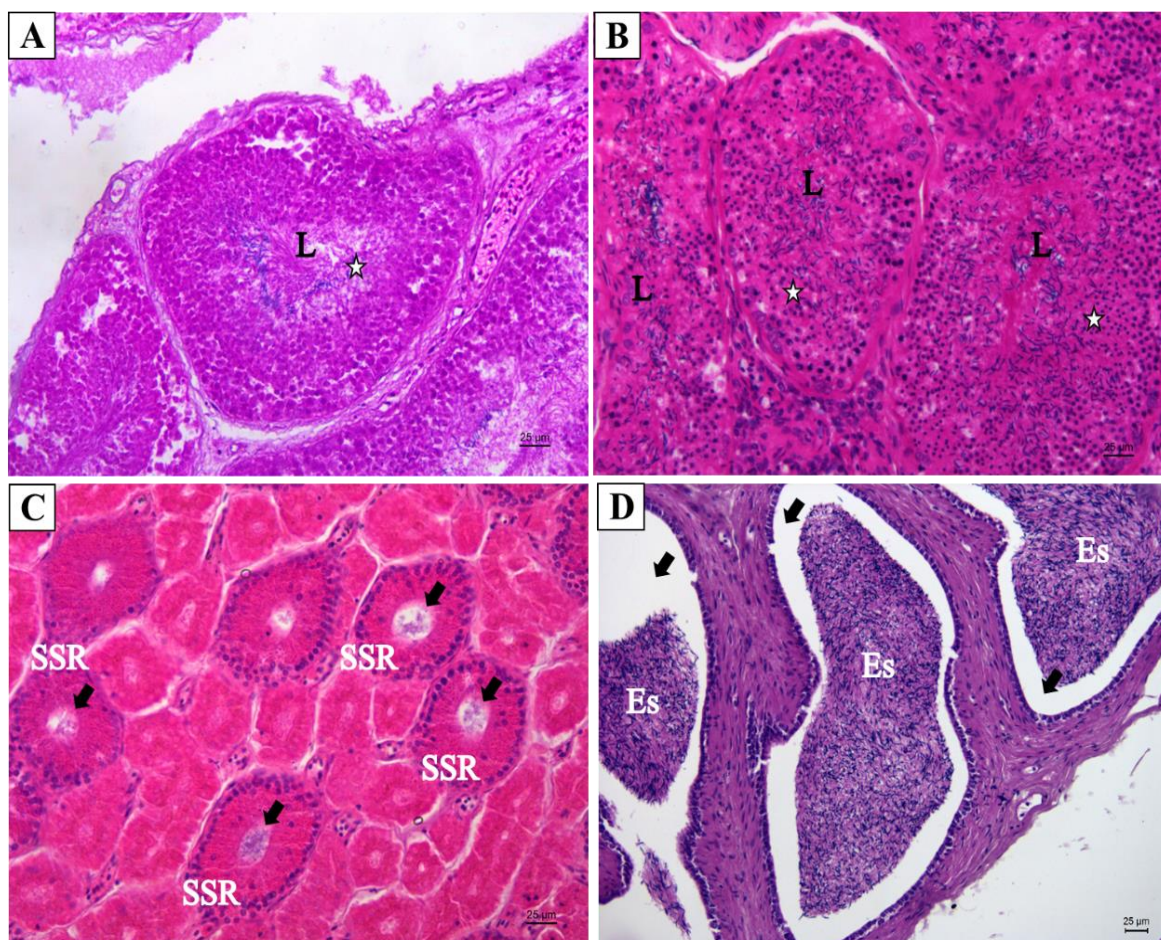


Figura 17. Cortes histológicos longitudinais do rim, testículo e ducto deferente de espécimes de *Micrurus frontalis*, coletados na primavera. Coloração H/E. **(A e B)** testículo mostrando grande concentração de espermatozoides no lúmen; estrela indicando a espermiogênese. **(C)** segmento sexual renal (SSR) hipertrofiado e com grânulos secretados no lúmen. **(D)** ducto deferente apresentando espaços em sua luz do túbulo e o epitélio de transição, indicado pela estrela verde. Objetiva de 20x. Escala 25 µm. **(Seta preta e L)** indicando a luz do túbulo ou ducto. **(Es)** espermatozoides. **(SSR)** segmento sexual renal.

Estação Verão

Os exemplares coletados no verão exibiram também o túbulo seminífero apresentando a fase de espermiogênica, porém não tão intensa quanto na primavera. A maioria dos espécimes desta estação possuíam a região distal do ducto deferente com a arquitetura do epitélio estratificado, semelhante ao epitélio de transição (Figura 18 C), estas características morfológicas geralmente estão relacionadas a processos de proteção e distensibilidade do ducto; da mesma forma o lúmen do ducto apresentou espaços vazios. O segmento sexual renal mostrou-se hipertrofiado e com o epitélio cheio de grânulos intensamente corados por eosina (Figura 18 D).

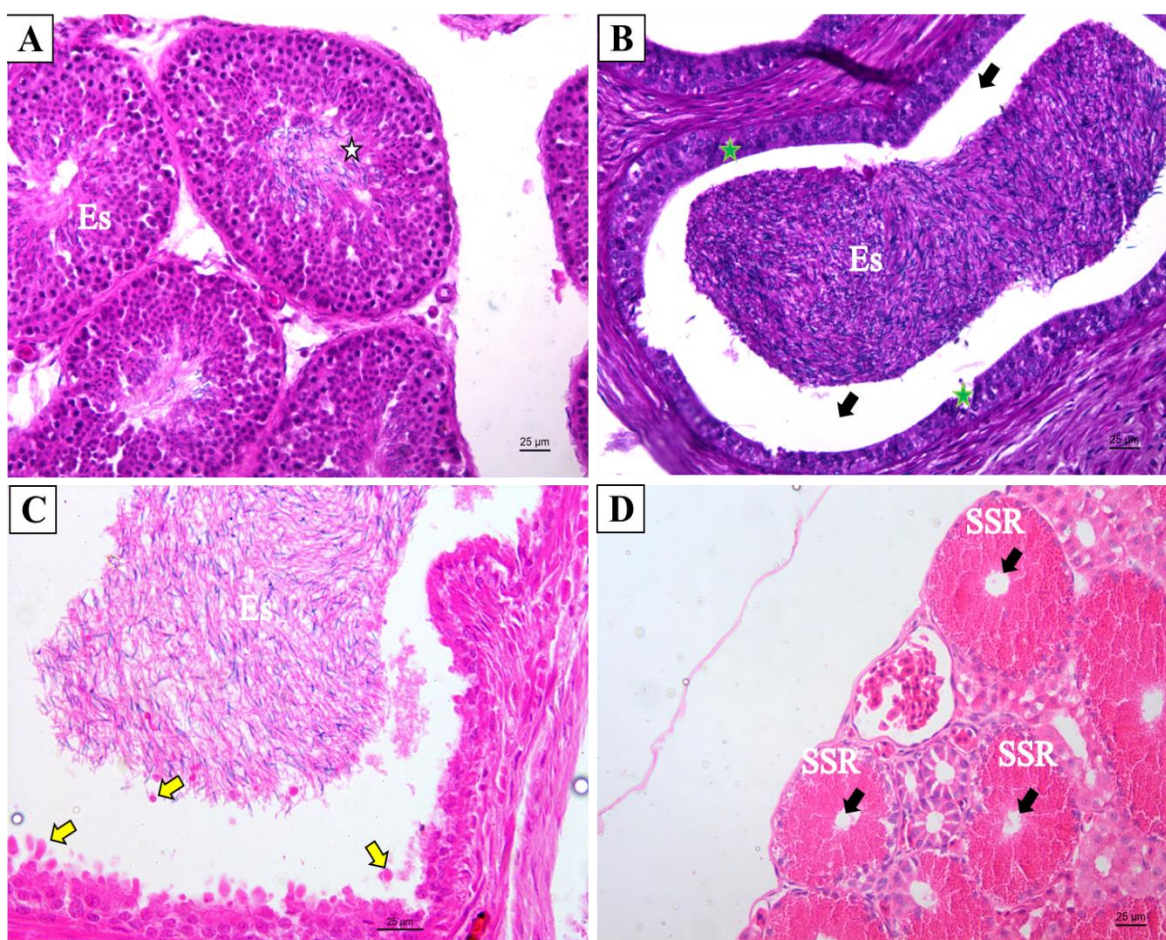


Figura 18. Cortes histológicos longitudinais do rim, testículo e ducto deferente de espécimes de *Micrurus frontalis*, coletados no verão. Coloração H/E. **(A)** testículo mostrando espermatozoides no lúmen; estrela indicando o início da espermiogênese, objetiva 20x. Escala 25 μ m. **(B e C)** ducto deferente apresentando na primeira imagem o epitélio de transição, indicado pela estrela verde; e na segunda imagem o epitélio do ducto deferente mostrando uma aparente secreção, indicado pela seta amarela. Objetiva de 10x. Escala 50 μ m. **(D)** segmento sexual renal (SSR) hipertrofiado e com grânulos intensamente corados; objetiva de 20x. Escala 25 μ m. **(Seta preta)** indica a luz do túbulo ou ducto. **(Es)** espermatozoides. **(SSR)** segmento sexual renal.

Estação Outono

Os exemplares coletados na estação do outono apresentaram uma diminuição significativas na quantidade de espermatozoides na luz do túbulo seminífero, mostrando uma redução metabólica da atividade testicular, entrando quase em período de quiescência (Figura 19A, B). O SSR ainda apresenta hipertrofia mas aparentemente há uma menor concentração de grânulos no citoplasma das células epiteliais, sendo possível observar uma diferença de coloração na borda apical do epitélio, próxima ao lúmen. A região distal do ducto deferente mostrou uma diminuição dos espaços no lúmen (Figura 19).

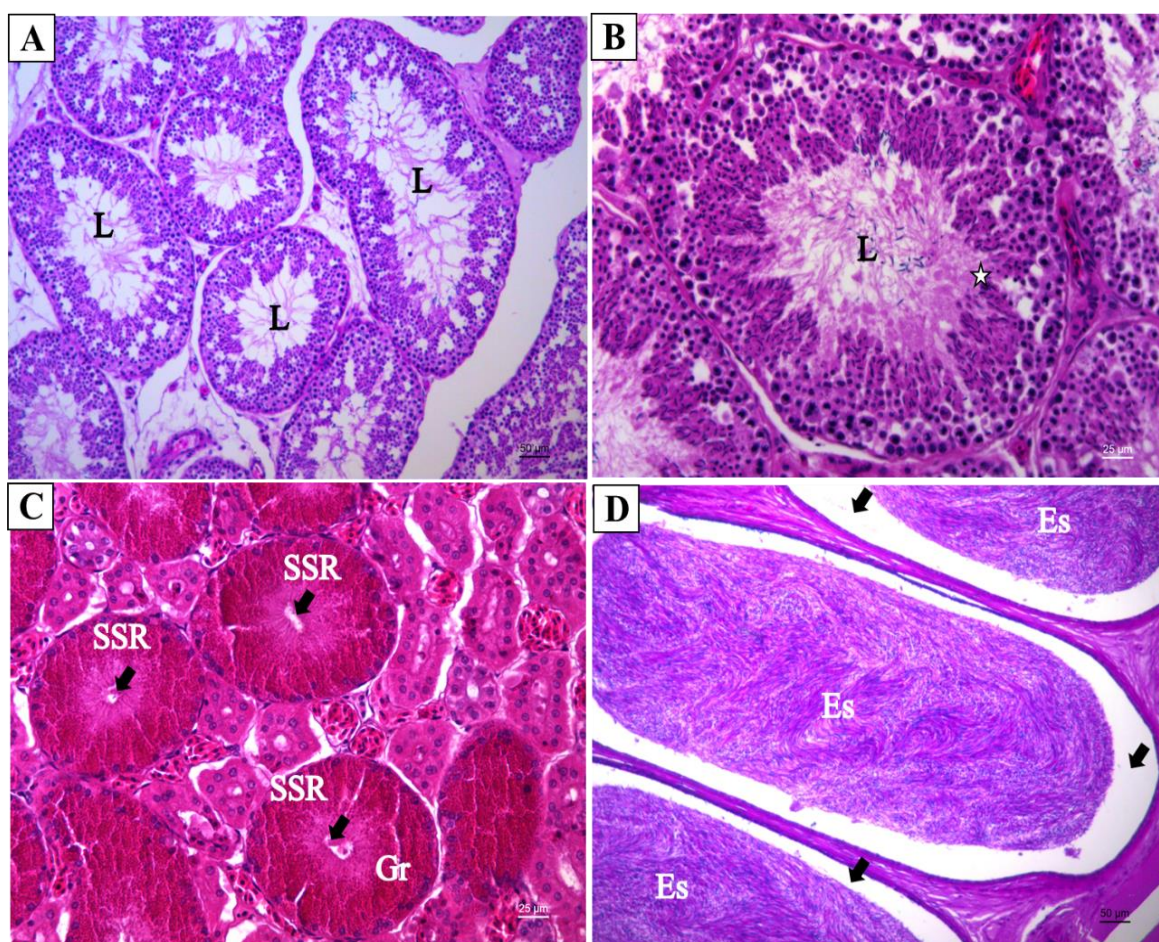


Figura 19. Cortes histológicos longitudinais do rim, testículo e ducto deferente de espécimes de *Micrurus frontalis*, coletados no outono. Coloração H/E. **(A e B)** testículo mostrando uma diminuição na concentração de espermatozoides no lúmen; estrela indicando a espermiogênese. **(C)** segmento sexual renal hipertrofiado, mostrando região mais intensamente corada por eosina na base. Objetiva de 20x. Escalas 25 μ m. Coloração H/E. **(D)** ducto deferente apresentando espaços em sua luz. Seta preta indica a luz do túbulo. Objetiva de 10x. Escala 25 μ m. **(Es)** espermatozoides. **(SSR)** segmento sexual renal. **(L)** luz do túbulo seminífero.

HISTOQUÍMICA: COLORAÇÃO ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF (PAS)

Foi testada a coloração do ácido periódico de *Schiff* com hematoxilina, e mesmo não tendo sido muito intensa a reação foi positiva, tanto para os grânulos do SSR quanto para a membrana basal do túbulo seminífero, ou seja, isso constata a presença de estruturas ricas em açúcares, no caso carboidratos neutros (Figura 20).

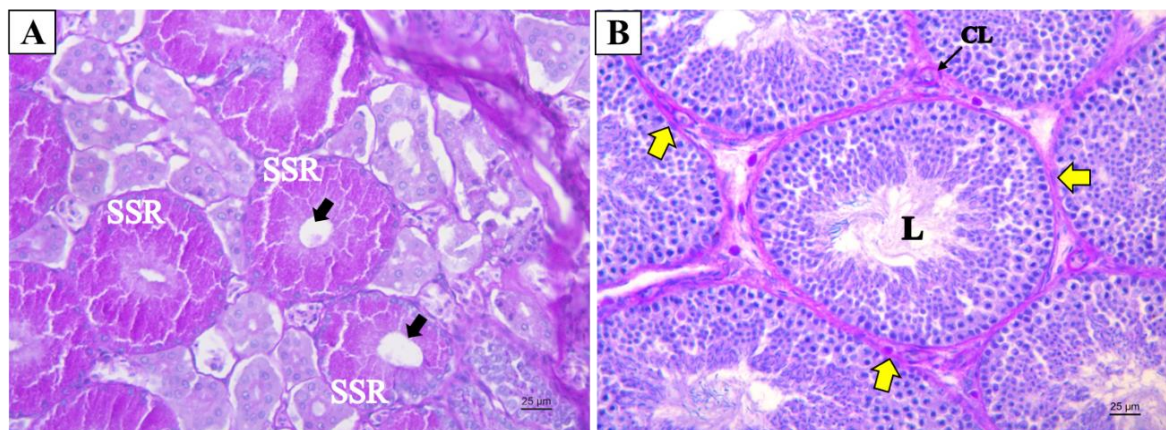


Figura 20. Cortes histológicos longitudinais do rim e testículo de espécimes de *Micrurus frontalis*, coletados no outono e verão. Coloração de PAS e Hematoxilina. **(A)** Segmento sexual renal com reação positiva ao ácido periódico de *Schiff*. **(B)** nos túbulos seminíferos, reação positiva apenas na lâmina basal e na célula de Leydig indicado por **(CL)**.

HISTOQUÍMICA: COLORAÇÃO AZUL ALCIAN PH 2,5 (AB) COM HEMATOXILINA E AZUL DE BROMOFENOL

As colorações histoquímicas foram testadas em no rim de espécimes de *M. corallinus* e *M. frontalis*, os resultados obtidos foram os mesmos para ambas as espécies. A análise do segmento sexual renal para a reação de azul alcian (AB) apresentou diferentes reações dos SSR, os grânulos dentro do citoplasma do SSR tiveram reação negativa ao AB, porém quando estes estavam no do túbulo alguns apresentavam reação ao AB (Figura 21A) enquanto outros SSR não demonstraram a mesma resposta na mesma lâmina (Figura 21B). Para a coloração azul de bromofenol (BB), o SSR exibiu reação positiva e intensa para a presença de proteína (Figura 21C, D).

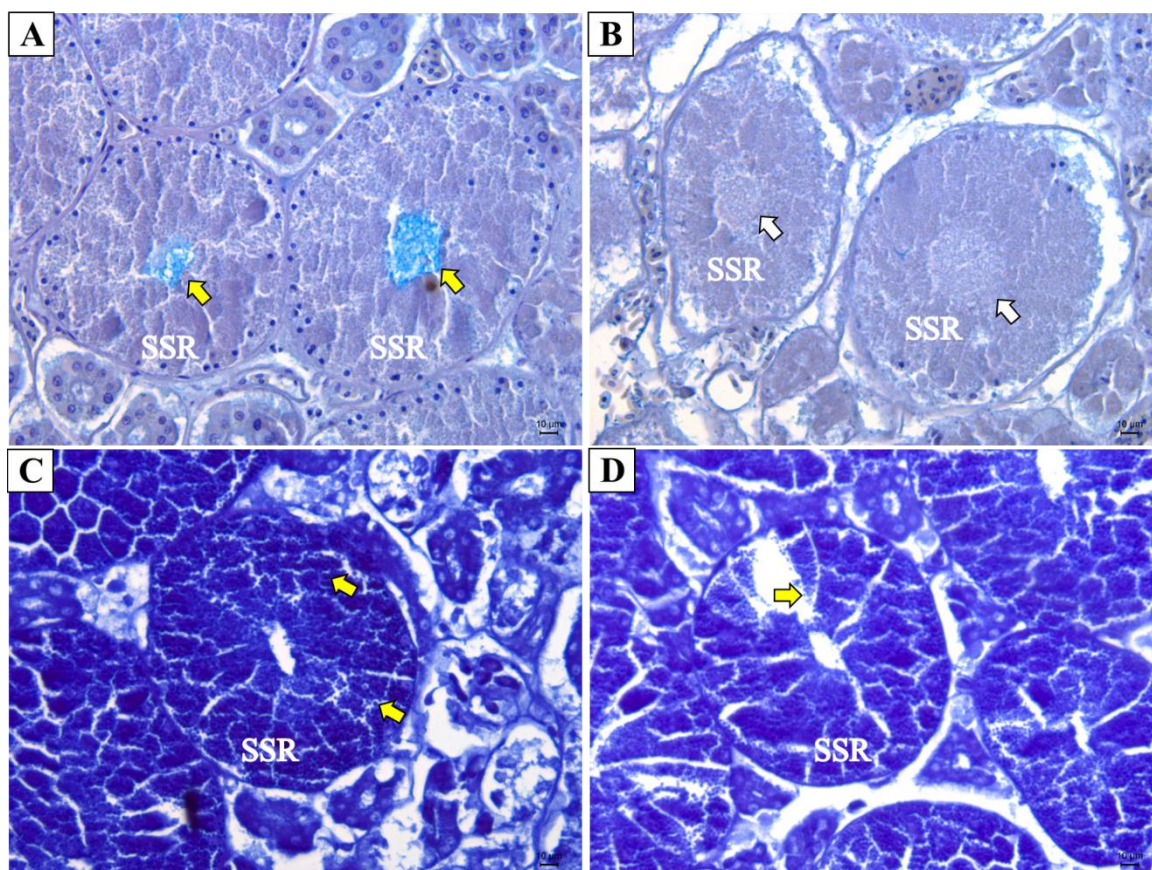


Figura 21. Cortes histológicos longitudinais do rim, de *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis*. Objetiva de 40x. Escalas 10 μm. **(A)** Segmento sexual renal com reação positiva ao azul alcian (AB). **(B)** Segmento sexual renal não reativo ao AB. **(C e D)** Segmento sexual renal com reativos ao azul de bromofenol. **(SSR)** segmento sexual renal. **(Seta amarela)** indicando grânulos reativos ao corante. **(Seta branca)** indicando grânulos na luz do túbulo não reativos ao AB.

DISCUSSÃO

DIMORFISMO SEXUAL DE COMPRIMENTO.

As diferenças relacionadas ao dimorfismo sexual podem estar ligadas tanto a fatores de seleção sexual quanto de seleção natural. As vantagens físicas como tamanho, força e destreza, permitiriam a sobrevivência do indivíduo ao mesmo tempo em que possibilita maior número de cópulas e, consequentemente, gerar descendentes férteis (DUBEY et al., 2009).

O dimorfismo pode aparecer como alterações de proporções anatômicas, coloração e no formato das escamas (PIZZATO et al., 2007). Em serpentes as análises sobre o dimorfismo podem abranger estudos de morfometria, padrões reprodutivos, existência de combate na disputa pela fêmea, comportamento sexual, análises filogenéticas, dentre outros (SHINE, 1994).

Shine (1994) realizou um estudo sobre dimorfismo sexual de comprimento, com espécies da família Colubridae e Elapidae, relacionando o índice de dimorfismo sexual com a presença ou ausência do comportamento de combate. Ele constatou um padrão nas duas famílias, as espécies em que o macho possuía o comportamento de combate na época reprodutiva (ou de cópula), o macho era maior que a fêmea. E nas espécies em que o macho não tinham o comportamento de combate na época reprodutiva, as fêmeas eram maiores.

Marques et al. (2013) testaram a mesma hipótese, porém neste trabalho a comparação foi entre as linhagens de coral, BRM (anéis pretos em mônade) e BRT (anéis pretos em tríades). Como resultado foi observado que no grupo BRM as fêmeas possuíam o Crc maior que o dos machos e no grupo BRT, no qual já havia relatos de combate no grupo, os machos eram maiores.

Os resultados encontrados pela biometria de *M. corallinus* e *M. frontalis*, mostram resultados semelhantes apresentados por Marques et al. (2013). As fêmeas apresentaram o Crc maior que o dos machos em *M. corallinus*, enquanto que em *M. frontalis* os machos são maiores. Almeida-Santos et. al (1998) registrou o comportamento de combate no grupo BRT, possivelmente no período reprodutivo, no mesmo período em cativeiro foram observados o comportamento de combate. No entanto para *M. corallinus* (grupo BRM) não foi registrado nenhum comportamento de

combate entre machos, corroborando a hipótese proposta por Marques (2013) para as duas linhagens.

Na ausência do combate na espécie *M. corallinus*, existe a hipótese levantada por Almeida-santos et al. (2006) da ocorrência da formação agregação sexual na hora da cópula e esta seria uma das explicações do macho de *M. corallinus* possuir uma cauda muito maior que a da fêmea.

Os resultados aqui expostos mostram que nas duas espécies, os machos apresentam o comprimento da cauda maior, comparado com as fêmeas. Cabe ressaltar que proporcionalmente (dividindo o valor da C_{cab} e C_{cau} pelo C_{rc}) essa diferença é ainda mais significativa em *M. corallinus* sendo claramente observável macroscopicamente, o que não é tão perceptível em *M. frontalis*.

Nas espécies em que ocorre agregação sexual, é observado vários machos enrolados sobre a fêmea, estes então disputando o acesso a cloaca da fêmea e consecutivamente a cópula. Desta forma, a cauda maior seria utilizada para afastar e impedir o acesso de outros machos à cloaca da fêmea (ALMEIDA-SANTOS et al., 1998; RIVAS E BURGHARDT, 2001; PIZZATO et al., 2007).

Uma segunda explicação, deste dimorfismo da cauda nos machos, seria pelo fato desta região abrigar o músculo retrator do hemipênis (PIZZATO et al., 2007). Porém todos os machos abrigam, na cauda, o musculo retrator. O diferencial então seria o próprio volume da membrana do hemipênis na região caudal. Para testar essa hipótese, seriam necessárias análises comparativas em relação as diferenças no tamanho ou comprimento do hemipênis entre as espécies.

CICLO DOS MACHOS: BIOMETRIA INTERNA E HISTOLOGIA.

Os estudos com reprodução tentam examinar o ciclo gametogênico em um nível individual e populacional, para se averiguar se existe algum tipo de sincronia entre os indivíduos (do mesmo sexo e entre os sexos) para se entender, de fato, como a espécie se reproduz. A abordagem histológica para compreensão do ciclo, tornou-se indispensável para se entender as estratégias existentes nas espécies de serpentes (MATHIES, 2011; ALMEIDA-SANTOS et al., 2014).

O ciclo reprodutivo dos machos de *M. frontalis* é praticamente inexistente na literatura, bem como para outras espécies do grupo BRT. Existem apenas algumas informações envolvendo aspectos biométricos para averiguar o dimorfismo sexual.

E mais recentemente Marques et al. (2013), apresentaram dados sobre a variação do comprimento dos testículos indicando períodos de maior atividade testicular.

Neste trabalho não houve variação significativa no comprimento do testículo e do diâmetro do ducto deferente em *M. frontalis*. Os machos teriam então uma espermatogênese assazonal e com maior produção de espermatozoides no verão (MARQUES et al., 2013).

Já para a espécie *Micrurus corallinus* as informações existentes sobre o ciclo reprodutivo dos machos foram expostas por Almeida-Santos et al. (2006), pela biometria a estação com maior comprimento médio do testículo ocorreu no outono e no ducto deferente o pico aconteceu na primavera. Os machos de *M. corallinus* mostraram, no presente trabalho, um ciclo pós nupcial assim como foi classificado por Almeida-Santos et. al (2006) e Marques et al., (2013).

Os resultados aqui expostos para *M. corallinus* abordaram uma análise morfométrica e histológica, ambos indicaram períodos semelhantes do pico espermatogênico e de maior quantidade de espermatozoides no ducto deferente, mesmo não tendo sido encontrado diferenças significativas no volume testicular e no diâmetro do ducto deferente.

O gráfico do volume testicular mostrou que o verão foi a estação com menor volume, pela histologia foi possível observar que provavelmente isto aconteceu devido ao período de quiescência ter acontecido na primavera, conseqüentemente o volume diminuiu na estação seguinte. Da mesma forma, o gráfico também mostrou que o pico volumétrico aconteceu entre o inverno e a primavera; e a histologia mostrou que a luz do túbulo seminífero estava com máxima produção espermiogênica no inverno.

A biometria do ducto deferente mostrou o maior diâmetro na estação do inverno, enquanto que o menor diâmetro ocorreu no verão. Pela histologia foi possível observar um progressivo aumento da concentração de espermatozoides no lúmen do verão até o inverno. E uma redução acentuada na primavera, indicando assim a época da cópula.

A estrutura nomeada de *ampulla* descrita primeiramente em mamíferos foi encontrada em algumas espécies de serpentes, com a função de servir como um

local para estocar os espermatozoides na região distal do ducto deferente, até a época da cópula. Em algumas espécies a produção de espermatozoides não é contínua, ocorrendo então um período de quiescência no epitélio germinativo (SEVER; 2004; GIST, 2011).

Sever (2004) reportou a presença da *ampulla* em *Seminatrix pygaea*, semelhante à dos mamíferos, apresentando dobras ou pregas na região do epitélio do ducto deferente, porém este não mostrou atividade secretora. Em Squamata a função e a arquitetura desta estrutura pode variar entre as espécies (SIEGEL et al., 2011). A *ampulla* já foi evidenciada em espécies subtropicais como *Sibynomorphus mikanii* e *Bothrops leucurus* (ROJAS et al., 2013; BARROS et al., 2014).

Em *M. corallinus* e *M. frontalis* não foram observadas cristas na região do epitélio do ducto deferente (distal), caracterizando a *ampulla*, normalmente o epitélio apresentava-se simples e cúbico. Na primavera, foram observadas apenas algumas ondulações e uma estratificação do epitélio do ducto deferente de *M. corallinus*. Possivelmente a formação da estrutura de dobras ou cristas no epitélio seja pela expansão e contração das paredes do ducto. Conforme a elasticidade e a resiliência do epitélio, em cada espécie, esta estrutura estará presente ou não. Assim sendo, a ausência das cristas que caracterizam a estrutura da *ampulla* não significa necessariamente que a estratégia de estocagem esteja ausente. Análises comparativas do ducto deferente, assim como do testículo entre as estações são necessárias para se obter essa informação.

O volume renal total apresentou variação significativa das médias entre as estações, sendo que o inverno mostrou volume máximo e no verão o menor. Pela a histologia, observou-se progressivas modificações em relação a quantidade de grânulos presentes no citoplasma epitelial, na intensidade da coloração destes e no volume de grânulos liberados na luz do túbulo contorcido distal. Os períodos de liberação dos grânulos foram no outono ao inverno, desta forma a os resultados da biometria e da histologia convergem para a estação do inverno como sendo o período de maior atividade do SSR.

A relação existente entre a atividade do SSR com a espermatogênese é devido ao fato que ambos são andrógenos dependentes (BISHOP, 1959; SEVER, 2002; KROHMER, 2004). É possível que o SSR por estar hipertrofiado e

com grânulos no citoplasma, tenha iniciado a liberação dos grânulos no outono, em razão do aumento de esteroides sexuais. Obtendo assim uma resposta rápida, enquanto o aumento da atividade germinativa só foi evidenciado no inverno.

Existem diversas hipóteses sobre a real função dos grânulos produzidos pelo segmento sexual renal, como a formação do *plug* copulatório (Volsøe 1944); o de servir como nutriente para os espermatozoides terem uma maior longevidade ou durabilidade ao serem estocados (BISHOP, 1959); diminuir a viscosidade seminal, melhorando assim o escoamento do fluido seminal no sulco do hemipênis (BISHOP, 1959); indução na formação do *útero muscular twisting* (UMT); servir como uma *plug* não coagulado, ou seja um líquido que iria dificultar a mobilidade dos espermatozoides, de cópulas subsequentes, depois de algumas horas (WISNIEWSKI, 2007).

Dentro destas hipóteses sobre a função dos grânulos produzidos pelo Segmento sexual renal, a mais coerentes seria a de servir como nutriente para os espermatozoides em uma eventual estocagem. Pelo fato que as fêmeas de *M. corallinus* e *M. frontalis* estocam espermatozoides no oviduto.

A histoquímica do segmento sexual renal em ambas as espécies mostrou que os grânulos tiveram reatividade PAS, BB e baixa reação para AB, ou seja, os grânulos possuem em sua composição carboidratos neutros, cadeias polipeptídicas ou proteínas e pouca quantidade de mucopolissacarídeos ácidos.

Esses indícios da composição dos grânulos do SSR são importantes para a investigação da sua real funcionalidade. Partindo-se da hipótese dos grânulos servirem como nutriente para os espermatozoides, a intensa reação para a presença de carboidratos neutros mostra que há porções que podem ser utilizadas como fonte de energia. Como os grânulos se juntam ao sêmen, estes podem ser uma rica fonte de energia para os espermatozoides quando estes são armazenados nos túbulos e receptáculos de estocagem presentes no oviduto da fêmea.

Na análise comparativa da histologia em *M. frontalis* entre as estações primavera, verão e outono foi possível constatar diferenças significativas em relação a atividade espermatogênica e atividade do segmento sexual renal.

As estações com maior atividade testicular são a primavera e o verão, sendo que a maior concentração de espermatozoides na luz do túbulo seminífero foi observada principalmente na primavera. Ao mesmo tempo, que na primavera, o SSR exibiu grânulos no lúmen. Como o testículo e o SSR são andrógenos

dependentes (ALDRIDGE et al., 2011) isso sinaliza maiores níveis de testosterona e consequentemente maior investimento reprodutivo neste período.

Em uma análise qualitativa a região distal do ducto deferente em *M. frontalis* não exibiu diferenças significativas em relação a variação de concentração de espermatozoides no lúmen do ducto. Indicando então não haver um processo de estocagem de espermatozoides, ao mesmo tempo não foram observadas características morfológicas que evidenciassem a estrutura da *ampulla* nesta espécie. Porém para confirmar a ausência da estratégia de estocagem são necessárias análises das lâminas, quanto a variações do diâmetro do ducto deferente.

Na análise do ciclo reprodutivo dos machos Aldridge e Duvall (2002), observaram que algumas espécies de viperídeos o mostravam variações na atividade testicular e o período máxima produção espermática não ocorria na época de cópula. O mesmo fato foi constatado em *Sibynomorphus mikanii* (ROJAS et al., 2013) e assim também observado neste trabalho em *M. frontalis* e *M. corallinus*.

Utilizando a classificação proposta por Mathies (2011), a espécie *Micrurus corallinus* possui então o ciclo sazonal, sendo que os indivíduos teriam um ciclo descontínuo sincronizado. A espécie *Micrurus frontalis* também exibiu um ciclo sazonal, porém os machos não apresentaram uma regressão testicular completa, assim o ciclo é contínuo e semi-sincronizado, com máxima produção de espermatozoides na primavera e com período de quiescência no outono.

COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE OBTENÇÃO DO VOLUME

Na comparação dos dois métodos de obtenção do volume testicular e renal, não houve uma diferença significativa entre os dois métodos, ou seja, teoricamente ambos podem ser utilizados. Este mesmo resultado foi observado por Leme et al. (2014) porém foram feitos somente análises do volume no rim e no baço.

A vantagem do método utilizando a proveta está na sua maior precisão, principalmente em relação ao formato do órgão diferir da forma elíptica, do qual se origina a fórmula utilizada para o cálculo do volume. A presença de ondulações, dobras ou tortuosidades podem aumentar o erro no cálculo convencional. Ao mesmo tempo, que o método da proveta minimiza o erro humano por se tratar de apenas uma medição ao invés de três (comprimento, largura e espessura).

CONCLUSÕES

- i. O dimorfismo sexual foi observado nas duas espécies, em *M. corallinus* as fêmeas atingem possuem em média um comprimento rostro-cloacal (Crc) maior que o dos machos, entretanto os machos exibem uma cauda significativamente maior, corroborando os dados da literatura. Um dado novo é que ao fazer a proporção do comprimento da cabeça em relação ao corpo, os machos de ambas as espécies percentualmente possuem cabeças maiores.
- ii. A histoquímica do segmento sexual renal, em ambas as espécies, mostrou que os grânulos são ricos em carboidratos neutros, e poção cadeias polipeptídicas, assim como estes grânulos se juntam com o sêmen é provável que estes sirvam como fonte de energia para manutenção e sobrevivência dos espermatozoides. Sendo um forte indício que esses ajudem na sobrevivência dos espermatozoides nos receptáculos de estocagem no oviduto das fêmeas.
- iii. Em *M. corallinus* a histologia apontou um direcionamento do pico de produção de espermatozoides, estocagem no ducto deferente e máxima hipertrofia com grânulos no lúmen, na estação do inverno. Assim o macho possui o ciclo pós-nupcial, descontínuo e sincronizado; partindo da ideia que o acasalamento ocorra na primavera.
- iv. Em *M. frontalis* o macho apresenta uma diminuição da atividade germinativa no outono e pico espermático na primavera; o segmento sexual renal (SSR) exhibe hipertrofia em quase todas as estações, a secreção dos grânulos no lúmen ocorre na primavera; não houve diferenças, aparente, na concentração de espermatozoides na região distal do ducto deferente. Assim sendo, A espécie *Micrurus frontalis* possui um ciclo sazonal, os machos exibem o ciclo contínuo, semi-sincronizado entre os indivíduos.

REFERÊNCIAS

- ALDRIDGE, R. D.; DUVALL, D. Evolution of the mating season in the pitvipers of North America. **Herpetological Monographs**, v. 16, n. 1, p. 1-25, 2002.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; AGUIAR, L. F. S. A.; BALESTRIN, R. L. *Micrurus frontalis* (coral snake). Male combat. **Herpetological Review**, v. 29, p. 242, 1998.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M. et al. Predatory combat and tail wrestling in hierarchical contests of the Neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes: Viperidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 20, n. 1, p. 88-96, 1999.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; PIZZATTO, L.; MARQUES, O. A. V. Intra-sex synchrony and intersex coordination in the reproductive timing of the coral snake *Micrurus corallinus* (Elapidae). **HERPETOLOGICAL JOURNAL**. Vol. 16, p. 371-376, 2006.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; BRAZ, H.B.; SANTOS, L.C.; SUEIRO, L.R.; BARROS, V.A.; ROJAS, C.A.; KASPEROVICZUS, K.N. Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados. **Herpetologia Brasileira**. V.3, n.1, p.14-24. 2014.
- ARAÚJO, L. M. G.; SERIGIOLLE, L. C.; GOMES, H. M. P.; RODRIGUES, D. A. B. ; LOPES, C. M.; LEME, P. L. S. Cálculo do volume de órgãos de ratos e sua aplicação na validação da relação de volumes entre a cavidade abdominal e o saco herniário em hérnias incisionais com “perda de domicílio”. **ABCD Arq Bras Cir Dig**. São Paulo. 27(3), p.177-181.2014.
- BARROS, V. A.; SUEIRO, L. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of phylogenetic conservatism of reproductive patterns. **The Herpetological Journal**, v. 22, n. 2, p. 97-104, 2012.
- BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Is rainfall seasonality important for reproductive strategies in viviparous Neotropical pit vipers? A case study with *Bothrops leucurus* from the Brazilian Atlantic Forest. **The Herpetological Journal**, v. 24, n. 2, p. 69-77, 2014.
- BISHOP, J. E. A histological and histochemical study of the kidney tubule of the common garter snake, *Thamnophis sirtalis*, with special reference to the sexual segment in the male. **Journal of Morphology**, v. 104, n. 2, p. 307-357, 1959.
- DEVINE, M. C. Copulatory plugs in snakes: enforced chastity. **Science**, v. 187, n. 4179, p. 844-845, 1975.
- DUBEY, S.; BROWN, G. P., MADSEN, T.; SHINE, R. Sexual selection favours large body size in males of a tropical snake (*Stegonotus cucullatus*, Colubridae). **Animal Behaviour**. 77(1), p.177-182. 2009.
- FOX, H. The urogenital system of reptiles. Biology of the Reptilia. In: GANS C.; PARSONS T.S. **Biology of the reptilian**. Editora Academic Press. p. 1-157. 1977.

GIST, D.H. Hormones and the sex ducts and sex accessory structures of reptiles In: NORRIS, D.O.; LOPEZ, K.H. **Hormones and Reproduction of Vertebrates**. 1. Ed. San Diego. Elsevier, p 117-139. 2011.

GREENE, H. W.; FOGDEN, Michael; FOGDEN, Patricia. **Snakes: the evolution of mystery in nature**. Univ of California Press, 1997.

JUNQUEIRA, L. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos, 1983.

KROHMER, Randolph W. Variation in seasonal ultrastructure of sexual granules in the renal sexual segment of the northern water snake, *Nerodia sipedon sipedon*. **Journal of morphology**, v. 261, n. 1, p. 70-80, 2004.

LABIOCEL, Laboratório de biologia celular da faculdade de medicina da Universidade de São Paulo. Manual de técnicas em histologia e biologia celular do Laboratório de biologia celular da faculdade de medicina da Universidade de São Paulo. 2002. Disponível em < <http://www.direxlim.fm.usp.br/download/manualtecnicas.pdf>>. Acesso em: 4/mar/2013.

LEME, L. M. G. D. A., SERIGIOLLE, L. C., GOMES, H. M. P., RODRIGUES, D. A. B., LOPES, C. M., & Squilacci, P. L. (1900). Cálculo do volume de órgãos de ratos e sua aplicação na validação da relação de volumes entre a cavidade abdominal e o saco herniário em hérnias incisionais com. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, 27(3), 177-181. 2014.

MARQUES, O. A. V. Reproduction, seasonal activity and growth of the coral snake, *Micrurus corallinus* (Elapidae), in the southeastern Atlantic forest in Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 17, n. 3, p. 277-285, 1996.

MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; RODRIGUES, M.G. Activity patterns in coralsnakes, genus *Micrurus* (Elapidae), in south and southeastern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v.1, n.2, p.99-105, 2006.

MARQUES, O. A. V.; PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive Strategies of New World Coral Snakes, Genus *Micrurus*. **Herpetologica**, v. 69, n. 1, p. 58-66, 2013.

MATHIES, T. Reproductive cycles of tropical snakes. In: ALDRIDGE, R.D.; SEVER, D.M. **Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes**. Enfield: Science Publishers, p. 511-550. 2011.

MUNIZ-DA-SILVA, D. F.; Ciclo reprodutivo da caninana, *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758) (serpentes:colubridae). Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, SP. 2013.

PLEGUEZUELOS, J. M.; FERICHE, Mónica. Reproductive ecology of the horseshoe whip snake (*Coluber hippocrepis*) in the Iberian Peninsula. **Journal of Herpetology**, p. 202-207, 1999.

PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; MARQUES, O. A. V. Biologia reprodutiva de serpentes brasileiras. in: NASCIMENTO, L, B.; OLIVEIRA, M. E. Herpetologia no Brasil II. (Eds.). Belo Horizonte: **Sociedade Brasileira de Herpetologia**, P. 201-221. 2007.

RIVAS, J. A.; BURGHARDT, G. M. Understanding sexual size dimorphism in snakes: wearing the snake's shoes. **Animal Behaviour**, v. 62, n. 3, p. F1-F6, 2001.

ROJAS C.A.; ALMEIDA-SANTOS S. M. Influência do ciclo do segmento sexual renal na determinação do acasalamento em *Sibynomorphus mikanii* (dormideira) (Serpentes, Dipsadinae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, p.154-156. 2008.

ROJAS, C. A.; BARROS, V. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. The reproductive cycle of the male sleep snake *Sibynomorphus mikanii* (Schlegel, 1837) from southeastern brazil. **Journal of morphology**, n.274, v.2. p.215-228. 2013

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

SEVER, David M. Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). IV. Occurrence of an ampulla ductus deferentis. **Journal of Morphology**, 2002.

SEVER, David M.; HAMLETT, William C. Female sperm storage in reptiles. **Journal of Experimental Zoology**, v. 292, n. 2, p. 187-199, 2002.

SEVER, David M. Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). IV. Occurrence of an ampulla ductus deferentis. **Journal of Morphology**, v. 262, n. 3, p. 714-730, 2004.

SEVER, D. M.; SIEGEL, D. S.; BAGWILL, A.; ECKSTUT, M. E.; ALEXANDER, L., CAMUS, A.; MORGAN, C. Renal sexual segment of the cottonmouth snake, *Agkistrodon piscivorous* (Reptilia, Squamata, Viperidae). **Journal of Morphology**, v. 269, n. 6, p. 640-653, 2008.

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

SIEGEL, D. S. et al. Female reproductive anatomy: cloaca, oviduct, and sperm storage. **Reproductive biology and phylogeny of snakes**, p. 347-409, 2011.

WISNIEWSKI, S. S. The role of the copulatory plug in *Lamprophis fuliginosus* and the contribution of the SSK in *Nerodia sipedon*. Master's Thesis, Saint Louis University, St. Louis, Missouri. 2007.

VOLSØE, H. Structure and Seasonal Variation of the Male Reproductive Organs of "*Vipera Berus*"(L.). **Thesis of the Faculty of Mathematics and Natural History of the University of Copenhagen**.. B. Lunos Bogtrykkeri, 1944.