



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

Eletra de Souza

Biologia Reprodutiva da surucucu-pico-de-jaca (*Lachesis muta*):
de Norte a Nordeste do Brasil

São José do Rio Preto
2020

Eletra de Souza

Biologia Reprodutiva da surucucu-pico-de-jaca (*Lachesis muta*):
de Norte a Nordeste do Brasil

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

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

São José do Rio Preto
2020

S729b

Souza, Eletra de

Biologia reprodutiva da surucucu-pico-de-jaca (*Lachesis muta*): : de Norte a Nordeste do Brasil / Eletra de Souza. -- São José do Rio Preto, 2020

142 p. : il., tabs., fotos, mapas

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

Orientadora: Selma Maria Almeida-Santos

1. Biologia. 2. Reprodução. 3. Aptidão biológica. 4. Espermatogênese em animais. 5. *Lachesis muta*. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Eletra de Souza

Biologia reprodutiva da surucucu-pico-de-jaca (*Lachesis muta*): de Norte a Nordeste do Brasil.

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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Selma Maria Almeida-Santos (Orientadora)
Instituto Butantan – São Paulo
Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Leticia Ruiz Sueiro
UNG – Guarulhos

Prof^ª. Dr^ª. Sonia Zanini Cechin
UFSM – Santa Maria

São Paulo
16 de abril de 2020

*Dedico este trabalho ao que me move a
continuar perseguindo meus sonhos.
Dedico à biodiversidade brasileira, nossa
fauna e flora, mas também a nossa brava
gente, que resiste em meio à lama, ao
fogo e ao óleo.*

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001. Correndo o risco de ser pragmática, gostaria de iniciar os agradecimentos saudando o instrumento de fomento à pesquisa que possibilitou a realização deste trabalho. Sem financiamento, essa e tantas outras pesquisas científicas não seriam possíveis.

Aos curadores das coleções visitadas, Dr. Hussan Zaher, Dr. Felipe Grazziotin e Giuseppe Puerto, Dra. Ana Lúcia Prudente, Dr. Paulo Passos e Dr. Luis Lousano, pelo empréstimo dos animais preservados sob seus cuidados. Aos técnicos e alunos dessas instituições, Valdir Germano, Aline Benetti, Francisco Brum, André Braga, Fabrício Sarmiento, Juli, Pedro Bisneto, Dani Gennari, Dani França, Nati Friol e Lays Guerreiro, pela ajuda e recepção acolhedora. À Dra. Fátima Q. Alves e Dr. Antônio Argôlo pela parceria no projeto e empréstimo das surucucus da Mata Atlântica.

À Dra. Marta Maria Antoniazzi e Dr. Carlos Jared por disponibilizarem o uso do laboratório para o preparo das imuno-histoquímicas e para as fotografias microscópicas. À técnica Luciana Sato por todo auxílio durante esses processos. Ao Felipe Sueiro e toda a equipe do Vet Pat por elaborarem boa parte das lâminas utilizadas nesse trabalho.

À UNESP e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do IBILCE (S. J. Rio Preto). Muito além de números e índices, busca lidar com pessoas e suas individualidades, se preocupa com os alunos e faz o possível para garantir equidade de oportunidades mesmo em tempos tão sombrios.

À minha orientadora, Dra. Selma Maria Almeida-Santos, por ter aceitado me orientar, guiar meus passos com carinho e se mostrar sempre interessada nas minhas ideias. Sou grata por ser compreensível nos momentos em que precisei me ausentar e por me apoiar nas minhas escolhas profissionais.

À Dra. Letícia Sueiro e à Dra. Sonia Cechin por aceitarem o convite de participarem da minha banca de defesa e por sempre priorizarem uma análise criteriosa e ética dos trabalhos científicos. À Dra. Lígia Pizzatto e à Dra. Marta Maria Antoniazzi por aceitarem o convite de participarem enquanto suplentes.

À Dra. Erika Hingst-Zaher pela orientação ao longo da minha carreira no Butantan, pelas conversas, as de bar e as reuniões, pelas oportunidades de ampliar os horizontes, e pela relação de amizade que construímos ao longo desse caminho.

Agradeço a todos os profissionais de limpeza, secretaria e manutenção do laboratório, Dona Vera, Dona Maria, Dona Marta, Regina, Darina, Sr. Déda e Sr. Robson, que proporcionam um ambiente sempre limpo e organizado para que o restante do trabalho seja possível.

Aos técnicos do laboratório, Kalena, Adriano, Kelly, Poli, Cristiene e Cinthia, por se mostrarem sempre solícitos e dispostos a me ajudar com o que fosse preciso.

Agradeço aos pesquisadores Dr. Otávio Marques e Myriam Caleffo, por todas as conversas, confraternizações e ideias de corredores que me foram essenciais.

Aos amigos do LEEV! Às risadas, descontrações, cafezinhos e docinhos. Sou especialmente grata ao Fabiano, Erick, Serena, Miguel, Diego, Karinhinha, Rafaela, Henrique, Letícia, Rebeca, Lucas, Silara, Nati e Karina Banci, por toda a ajuda e apoio emocional ao longo da minha dissertação.

Agradeço à Dra. Mariana Fogaça, uma pesquisadora incrível que eu admiro imensamente e tenho a honra de chamar de amiga. Seus conselhos, áudios de 15 minutos e e-mails são essenciais para a minha sanidade mental na pós-graduação. Sinto muita saudade dos nossos papos! Voa que é tudo seu!

Agradeço às minhas amigas de outras vidas, Raquel, Iri, Julie, Luiza, Michele, Giu, Carol, Rafa e Vick. Em especial agradeço à Pri, que me ajudou a formatar essa dissertação. Vocês são os melhores presentes que a vida me deu.

Agradeço ao meu companheiro de vida e de dissertação também, Bruno. Porque sem ele esse trabalho simplesmente não existiria. Topou ir pra (quase) todas as coleções comigo, e me ajudou dentro e fora do laboratório. Sou imensamente grata por ter ao meu lado alguém que quer ver o meu sucesso.

À minha sogra, Cida, que me apoia incondicionalmente em tudo que eu faço, e à Mônica, que sempre me anima com seus causos e sente um legítimo orgulho de mim. Obrigada por tudo!

E por último, mas não menos importante, quero agradecer a minha família.

Às minhas tias, Bernadete, por não medir esforços para me ajudar e por deixar eu morar em sua casa enquanto vivi em São Paulo. Margarete, por acreditar em mim e estar disposta a ir comigo aonde for. Elizabeth que, mesmo distante, se preocupa sempre com o meu bem-estar. Lucélia, muito orgulhosa da sobrinha querida, sempre tão amorosa. Zeidi, pelos papos cabeça e pela compreensão dessa louca vida de academia. Minhas tias são como mães e tenho um amor imenso por elas.

Aos meus tios (*in memoriam*), Lídio, Rubinho e Hélio, pelo profundo amor com todos ao seu redor, pela demonstração de força e superação, pelo exemplo de ética e caráter. Saudades eternas.

Aos meus irmãos Daniel e Luciane, e aos meus sobrinhos Gabriel e Lenina, pela cumplicidade e companheirismo. Aos meus muitos primos e primas, pelas agradáveis conversas, gargalhadas e comilanças.

Ao meu pai Claudio Mendel e à minha mãe Andreia Barros, que me ensinam o valor máximo do caráter, da ética e do profissionalismo. Me apoiam em absolutamente todas as minhas escolhas e fazem de tudo para me garantir o melhor. Tenho um orgulho imenso dos meus pais e sem o amor e a compreensão deles essa dissertação não seria possível.

Muito obrigada!

*“Sou biólogo e viajo muito pela savana do meu país.
Nessas regiões encontro gente que não sabe ler livros,
mas que sabe ler o seu mundo.
Nesse universo de outros saberes, sou eu o analfabeto.”*

Mia Couto (2011, p. 14)

RESUMO

O conjunto de características manifestadas por uma espécie que levam ao sucesso reprodutivo pode ser chamado de estratégias reprodutivas. Isto inclui, por exemplo, o período reprodutivo, o modo reprodutivo, a sincronia reprodutiva entre machos e fêmeas, o tempo de fertilização e a frequência reprodutiva. O gênero *Lachesis* é composto de quatro espécies ovíparas restritas às florestas úmidas da América Central e América do Sul. Popularmente conhecidas como surucucu, são um grupo de importância médica, tal como *Bothrops* e *Crotalus*. *Lachesis muta* é a espécie com a maior distribuição, e ocorre na América no Sul, na Mata Atlântica e na Floresta Amazônica. Ao contrário de *Bothrops* e *Crotalus*, estudos sobre biologia reprodutiva para o gênero *Lachesis* são, em sua maioria, desenvolvidos em cativeiro e com foco no comportamento reprodutivo. Propomos, então, descrever em dois capítulos aspectos da biologia reprodutiva da espécie *Lachesis muta* investigados a partir da anatomia e morfologia de seus órgãos reprodutivos ao longo das estações do ano. No Capítulo 1, investigamos a biologia reprodutiva de *L. muta* da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica brasileira a partir de dados de biometria e histologia de animais preservados em coleções biológicas e provenientes da natureza. No Capítulo 2, descrevemos o oviduto feminino em diferentes estágios do ciclo reprodutivo. Comparando tanto as duas populações quanto a espécie com outros crotalíneos neotropicais, nosso objetivo foi investigar possíveis padrões para o grupo Viperidae, assim como a hipótese da influência de fatores abióticos no ciclo reprodutivo de serpentes. Encontramos sazonalidade na espermatogênese dos machos para as duas populações, que ocorre ao longo da estação chuvosa (novembro a abril) na região Amazônica, e no outono e inverno (março a agosto) na região da Mata Atlântica. Também houve sazonalidade na vitelogênese das fêmeas, que coincidiu nas duas populações com a época da estação seca, na Amazônia, e outono/inverno na Mata Atlântica (maio a setembro). Adicionalmente, o resultado deste trabalho descreve pela primeira vez a estratégia reprodutiva de estocagem de espermatozoides nas fêmeas do gênero *Lachesis*.

Palavras-chave: Biologia reprodutiva. *Lachesis muta*. Estratégia de estocagem de espermatozoides. Ciclos reprodutivos. Espermatogênese.

ABSTRACT

The set of characteristics manifested by a species leading to reproductive success can be called reproductive strategies. These include, for example, the reproductive period, the reproductive mode, the reproductive synchrony between males and females, the time of fertilization, and the reproductive frequency. The genus *Lachesis* comprises four oviparous species restricted to Central and South American rainforests and popularly known as bushmasters, and is a group of medical importance, as are *Bothrops* and *Crotalus*. *Lachesis muta* is the most widely distributed and occurs in South America, at the Atlantic Forest and the Amazon Rainforest. Unlike *Bothrops* and *Crotalus*, reproductive biology studies for the genus *Lachesis* were mostly developed in captivity, focusing mainly on reproductive behavior. We propose to describe in two chapters aspects of the reproductive biology of the *Lachesis muta* species investigated from the anatomy and morphology of its reproductive organs over the seasons of the year. In Chapter 1, we investigate the reproductive biology of *L. muta* by biometric and histology data from biological collections, focusing on individuals collected in the wild. In Chapter 2, we describe the female oviduct at different stages of the reproductive cycle. Comparing both populations and species with the other neotropical crotalines, we aim to investigate possible patterns for the Viperidae group, as well as the hypothesis of the influence of abiotic factors on the snake reproductive cycle. For both populations, we find seasonality in male spermatogenesis, which occurs throughout the rainy season in the Amazon (November to April), and in autumn and winter in the Atlantic Forest (March to August); and in vitellogenesis of females, which occurs in the dry season in the Amazon and in autumn and winter in the Atlantic Forest (April to September). In addition, the result of this work describes for the first time the reproductive strategy of sperm storage in females of the genus *Lachesis*.

Keywords: Reproductive biology. *Lachesis muta*. Sperm storage strategy. Reproductive cycles. Spermatogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1 – Biologia reprodutiva da surucucu-pico-de-jaca, *Lachesis muta* (Linnaeus, 1766): de Norte a Nordeste do Brasil.

Figura 1.1 – Mapa da distribuição dos animais estudados neste trabalho.	27
Figura 1.2 – Climatogramas regionais para a Floresta Amazônica.	28
Figura 1.3 – Climatogramas regionais para o norte da Mata Atlântica.	29
Figura 1.4 – Maturidade sexual em fêmeas e machos.	30
Figura 1.5 – Folículos de <i>L. muta</i> .	31
Figura 1.6 – Medidas registradas para os machos em corte histológico.	32
Figura 1.7 – Atividade anual de indivíduos adultos de <i>Lachesis muta</i> da Amazônia.	36
Figura 1.8 – Atividade anual de indivíduos adultos de <i>Lachesis muta</i> da Mata Atlântica.	37
Figura 1.9 – Maturidade sexual em fêmeas de <i>Lachesis muta</i> - FA.	38
Figura 1.10 – Maturidade sexual em machos de <i>Lachesis muta</i> - FA.	38
Figura 1.11 – Maturidade sexual em fêmeas de <i>Lachesis muta</i> – MA.	39
Figura 1.12 – Maturidade sexual em machos de <i>Lachesis muta</i> – MA.	40
Figura 1.13 – Média e variação do comprimento rostro-cloacal (CRC) entre indivíduos adultos machos e fêmeas de <i>L. muta</i> .	41
Figura 1.14 – Correlação entre comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento da cauda (CC) entre machos e fêmeas de <i>L. muta</i> .	42
Figura 1.15 – Correlação entre comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento da cabeça (CCAB) entre machos e fêmeas de <i>L. muta</i> .	42
Figura 1.16 – Correlação entre o comprimento rostro-cloacal (CRC) e a largura da cabeça (LCAB) entre machos e fêmeas de <i>L. muta</i> .	43
Figura 1.17 – Média e variação do comprimento rostro-cloacal (CRC) entre indivíduos adultos machos e fêmeas de <i>L. muta</i> da Mata Atlântica.	44
Figura 1.18 – Correlação entre comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento da cauda (CC) entre machos e fêmeas de <i>L. mutada</i> Mata Atlântica.	45
Figura 1.19 – Média e variação do comprimento da cabeça (CCAB) entre indivíduos adultos machos e fêmeas de <i>L. mutada</i> Mata Atlântica.	45
Figura 1.20 – Média e variação da largura da cabeça (LCAB) entre indivíduos	46

adultos machos e fêmeas de <i>L. muta</i> da Mata Atlântica.	
Figura 1.21 – Correlação entre comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento do testículo de machos de <i>L. muta</i> .	47
Figura 1.22 – Média e variação do Log do Volume Testicular entre indivíduos adultos machos de <i>L. muta</i> ao longo das estações seca e chuvosa.	47
Figura 1.23 – Média e variação do Diâmetro do Ducto Deferente entre indivíduos adultos machos de <i>L. muta</i> ao longo das estações seca e chuvosa.	48
Figura 1.24 – Ciclo espermatogênico de <i>L. muta</i> .	49
Figura 1.25 – Média e variação do comprimento do Log do Diâmetro do Túbulo Seminífero para duas estações.	50
Figura 1.26 – Média e variação do comprimento da altura do Log do Epitélio do Túbulo Seminífero para duas estações.	50
Figura 1.27 – Média e variação do comprimento do Log do Diâmetro do Túbulo Seminífero para quatro estações.	51
Figura 1.28 – Média e variação do comprimento do Log do Epitélio do Túbulo Seminífero para quatro estações.	52
Figura 1.29 – Estocagem de espermatozoides no ducto deferente.	53
Figura 1.30 – Ciclo do Segmento Sexual Renal.	54
Figura 1.31 – Média e variação do comprimento do Log do Diâmetro do Segmento Sexual Renal (SSR) para duas estações.	55
Figura 1.32 – Média e variação do comprimento do Log da Altura do Epitélio do Segmento Sexual Renal (SSR) para duas estações.	55
Figura 1.33 – Média e variação do comprimento do Log do Diâmetro do Segmento Sexual Renal para quatro estações.	56
Figura 1.34 – Média e variação do comprimento do Log da Altura do Epitélio do Segmento Sexual Renal para quatro estações.	57
Figura 1.35 – Ciclo espermatogênico de <i>L. muta</i> .	58
Figura 1.36 – Média e variação do Log do Diâmetro do Túbulo Seminífero.	59
Figura 1.37 – Média e variação do Log da altura do Epitélio do Túbulo Seminífero.	59
Figura 1.38 – Ciclo do Segmento Sexual Renal.	60
Figura 1.39 – Média e variação do Log Diâmetro do Túbulo do SSR.	61
Figura 1.40 – Média e variação do Log da altura do Epitélio do Túbulo do SSR.	61
Figura 1.41– Ciclo reprodutivo dos machos de <i>L. muta</i> da população da Floresta	62

Amazônica e da Mata Atlântica.	
Figura 1.42 – Ciclo reprodutivo de fêmeas de <i>Lachesis mutata</i> Floresta Amazônica.	64
Figura 1.43 – Ciclo reprodutivo de fêmeas de <i>Lachesis mutata</i> Mata Atlântica.	65
Figura 1.44 – Correlação entre o log do comprimento rostro-cloacal (CRC) materno e o log do diâmetro do maior folículo ou ovo de fêmeas de <i>L. muta</i> .	67
Figura 1.45 – Plug copulatório na região vaginal de <i>L. muta</i> – FA.	68
Figura 1.46 – Estocagem de espermatozoides na junção útero-vaginal (UMT) de <i>L. muta</i> .	69
Figura 1.47 – Estocagem de espermatozoides no infundíbulo posterior de <i>L. muta</i> .	70
Figura 1.48 – Plug copulatório na região vaginal de <i>L. muta</i> – MA.	71
Figura 1.49 – Estocagem de espermatozoides em <i>L. muta</i> .	72
Figura 1.50 – Ciclo reprodutivo das fêmeas de <i>L. muta</i> da população da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica.	73
Figura 1.51 – Resumo do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de <i>L. muta</i> da população da Floresta Amazônica.	74
Figura 1.52 – Resumo do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de <i>L. muta</i> da população da Mata Atlântica.	75
Quadro 1.1 – Classificação dos túbulos seminíferos nas fases espermatogênicas.	32
Capítulo 2 – Estocagem de espermatozoides e aspectos morfológicos do oviduto de <i>Lachesis muta</i> (Serpentes: Viperidae).	
Figura 2.1 – Aspecto geral do UMT de <i>Lachesis muta</i> .	108
Figura 2.2 – Tipos morfológicos do UMT encontrados em fêmeas diferentes de <i>Lachesis muta</i> .	108
Figura 2.3 – Microscopia Eletrônica de Varredura da região do útero aglandular onde é formado a UMT em <i>Lachesis muta</i> .	109
Figura 2.4 – Região do útero aglandular onde é formado o UMT em <i>Lachesis muta</i> – Corte transversal.	110
Figura 2.5 – Região do útero aglandular onde é formado o UMT em <i>Lachesis muta</i> – Corte longitudinal.	111
Figura 2.6 – Corte longitudinal da região do infundíbulo posterior.	113

Figura 2.7 – Estocagem de espermatozoides no infundíbulo posterior de <i>Lachesis muta</i> .	114
Figura 2.8 – Estocagem de espermatozoide no UMT de <i>Lachesis muta</i> .	115
Figura 2.9 – Infundíbulo posterior.	116
Figura 2.10 – Média e variação do comprimento do epitélio do infundíbulo posterior.	116
Figura 2.11 – Infundíbulo posterior de <i>Lachesis muta</i> em estágio de vitelogênese secundária indicando reação positiva para PAS e AB na região epitelial.	117
Figura 2.12 – Infundíbulo posterior de <i>Lachesis muta</i> em estágio de prenhez indicando reação positiva para PAS e AB na região epitelial.	118
Figura 2.13 – Infundíbulo posterior de <i>Lachesis muta</i> em diferentes estágios reprodutivos em reação negativa para BB na região epitelial	119
Figura 2.14 – UMT de <i>Lachesis muta</i> em diferentes estágios reprodutivos em reação positiva para AB na região epitelial.	120
Figura 2.15 – UMT de <i>Lachesis muta</i> em reação negativa para o PAS.	121
Figura 2.16 – UMT de <i>Lachesis muta</i> em diferentes estágios do ciclo reprodutivo em reação negativa para BB na região epitelial.	122
Figura 2.17 – Média e variação do comprimento do epitélio da vagina.	123
Figura 2.18 – Vagina de <i>Lachesis muta</i> em diferentes estágios do ciclo reprodutivo em reação positiva para AB na região epitelial.	124
Figura 2.19 – Vagina de <i>Lachesis muta</i> em diferentes estágios do ciclo reprodutivo em reação positiva para PAS na região epitelial.	125
Figura 2.20 – Vagina de <i>Lachesis muta</i> em diferentes estágios do ciclo reprodutivo em reação positiva para AB na região epitelial	126
Figura 2.21 – Média e variação do comprimento do epitélio do útero glandular.	127
Figura 2.22 – Média e variação do diâmetro das glândulas do útero glandular.	127
Figura 2.23 – Útero glandular de <i>Lachesis muta</i> em diferentes estágios do ciclo reprodutivo.	128
Figura 2.24 – Útero glandular de <i>Lachesis muta</i> em diferentes estágios do ciclo reprodutivo em reação positiva para o AB na região epitelial.	129
Figura 2.25 – Útero glandular de <i>Lachesis muta</i> em diferentes estágios do ciclo reprodutivo em reação positiva para o PAS na região glandular.	130
Figura 2.26 – Útero glandular de <i>Lachesis muta</i> em diferentes estágios do ciclo	131

reprodutivo em reação positiva para o AB na região glandular.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 – Biologia reprodutiva da surucucu-pico-de-jaca (*Lachesis muta*): de Norte a Nordeste do Brasil.

Tabela 1.1 – Número total de indivíduos analisados no trabalho separados por bioma.	25
Tabela 1.2 – Dados morfológicos dos indivíduos adultos machos e fêmeas da população Amazônica de <i>L. muta</i> .	41
Tabela 1.3 – Dados morfológicos dos indivíduos adultos machos e fêmeas da população da Mata Atlântica de <i>L. muta</i> .	44
Tabela 1.4 – Fêmeas analisadas de <i>Lachesis muta</i> .	66

Capítulo 2 – Estocagem de espermatozoides e aspectos morfológicos do oviduto de *Lachesis muta* (Serpentes: Viperidae).

Tabela 2.1 – Espécimes examinados de <i>Lachesis muta</i> .	106
Tabela 2.2 – Espécimes de <i>Lachesis muta</i> os quais foram observados estocagem de espermatozoides.	112
Tabela 2.3 – Resumo das alterações secretórias que foram observadas no oviduto e nas estruturas encontradas (i.e., plug copulatório, UMT e espermatozoides) ao longo do ciclo reprodutivo das fêmeas de <i>Lachesis muta</i> .	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Alcian Blue
ANCOVA	Análise de Covariância
BB	Bromofenol Blue
CC	Comprimento da Cauda
CCAB	Comprimento da Cabeça
CRC	Comprimento Rostro-Cloacal
Dd	Ducto deferente direito
FA	Floresta Amazônica
FMT-HVD	Faculdade de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
H&E	Hematoxilina e Eosina
http	HyperTextTransferProtocol.
IBUSP	Coleção Herpetológica Alphonse Richard Hoge
IPd	Infundíbulo Posterior direito
L	Lúmen
LCAB	Largura da Cabeça
MA	Mata Atlântica
MPEG	Museu Paraense Emílio Goeldi
MZUSP	Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo
OVd	Ovário direito
PAS	Ácido Periódico de Schiff
Rd	Rim direito
SSD	Índice de Dimorfismo Sexual

SSR	Segmento Sexual Renal
UAd	Útero Anterior direito
UMT	Uterine Muscular Twisting/Contração Muscular Uterina
URL	UniformResourceLocator
V1	Vitelogênese primária
V2	Vitelogênese secundária
www	World Wide Web

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
Mm	Miligramas
π	Pi
μm	Micrometros
<	Menor

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Biologia reprodutiva da surucucu-pico-de-jaca, <i>Lachesis muta</i>		
	<i>(Linnaeus, 1766): de Norte a Nordeste do Brasil.</i>	19
1	INTRODUÇÃO	20
2	MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1	Os animais	25
2.2	Área de estudo	25
2.2.1	Floresta Amazônica (FA)	25
2.2.2	Mata Atlântica (MA)	26
2.3	Análise do dimorfismo e maturidade sexual	29
2.4	Caracterização do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de <i>Lachesis muta</i>	30
2.4.1	Histologia do trato reprodutivo masculino e feminino	31
2.5	Análises dos dados	33
3	RESULTADOS	35
3.1	Inferência do padrão de atividade a partir dos animais coletados	35
3.1.1	População Amazônica	35
3.1.2	População da Mata Atlântica	36
3.2	Maturidade sexual	37
3.2.1	População Amazônica	37
3.2.2	População da Mata Atlântica	39
3.3	Dimorfismo sexual	40
3.3.1	População Amazônica	40
3.3.2	População da Mata Atlântica	43
3.4	Ciclo reprodutivo dos machos	46
3.4.1	População da Floresta Amazônica	46
3.4.1.1	<i>Variação do comprimento e volume testicular</i>	46
3.4.1.2	<i>Variação do diâmetro do ducto deferente</i>	48
3.4.1.3	<i>Ciclo espermatogênico</i>	48
3.4.1.4	<i>Estocagem no ducto deferente</i>	52
3.4.1.5	<i>Segmento Sexual Renal (SSR)</i>	53
3.4.2	População da Mata Atlântica	57

3.4.2.1	<i>Ciclo espermatogênico</i>	57
3.4.2.2	<i>Estocagem no Ducto Deferente</i>	59
3.4.2.3	<i>Ciclo do Segmento Sexual Renal (SSR)</i>	60
3.4.3	Resumo do Ciclo reprodutivo dos machos de <i>L. muta</i>	62
3.5	Ciclo reprodutivo das fêmeas	63
3.5.1	Análise macroscópica do trato reprodutivo feminino	63
3.5.1.1	<i>População da Floresta Amazônica (FA)</i>	63
3.5.1.2	<i>População da Mata Atlântica (MA)</i>	64
3.5.2	Fecundidade	66
3.5.3	Plug copulatório e estocagem de espermatozoides	67
3.5.3.1	<i>População da Floresta Amazônica</i>	68
3.5.3.2	<i>População da Mata Atlântica</i>	70
3.6	Resumo do ciclo reprodutivo de fêmeas de <i>L. muta</i>	72
3.7	Resumo do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de <i>L. muta</i> da população da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica	73
4	DISCUSSÃO	75
4.1	Maturidade sexual, dimorfismo sexual e fecundidade	75
4.2	Ciclos Reprodutivos	79
4.3	Frequência Reprodutiva	85
4.4	Variações Interpopulacionais	86
5	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	91
CAPÍTULO 2: Estocagem de espermatozoides e aspectos morfológicos do oviduto de <i>Lachesis muta</i> (Serpentes: Viperidae)		
1	INTRODUÇÃO	101
2	MATERIAL E MÉTODOS	103
2.1	Os animais	103
2.2	Coleta de dados	104
2.3	Microscopia de luz	104
2.4	Microscopia eletrônica de varredura	105
2.5	Análise de dados	105
3	RESULTADOS	105
3.1	Uterine Muscular Twisting (UMT)	105
3.1.1	Aspecto morfológico da UMT	107

3.1.2	Aspecto microscópico da UMT	109
3.2	Estocagem de espermatozoides no oviduto	111
3.3	Alterações secretórias no oviduto ao longo do ciclo reprodutivo	115
3.3.1	Infundíbulo posterior	115
3.3.2	UMT	119
3.3.3	Vagina e plug copulatório	122
3.3.4	Útero glandular	126
3.4	Resumo das alterações secretórias no oviduto ao longo do ciclo reprodutivo	131
4	DISCUSSÃO	132
5	CONCLUSÃO	136
	REFERÊNCIAS	137

CAPÍTULO 1: Biologia reprodutiva da surucucu-pico-de-jaca, *Lachesis muta* (Linnaeus, 1766): de Norte a Nordeste do Brasil.

*“Em 1788 Carl von Linné nomeou a surucucu de *Crotalus mutus*, literalmente “a silenciosa cascavel”. Quase 40 anos depois, François-Marie Daudin designou-a em um novo gênero, *Lachesis*, o nome de uma das três Moiras gregas. Na mitologia grega, Clothos gira o fio da vida; Lachesis, aleatoriamente, escolhe o comprimento do fio; e Atropos faz o corte final. Talvez a escolha do jovem herpetólogo francês refletisse uma aversão generalizada entre os primeiros naturalistas, bem como os perigos lendários associados a essa cobra.”*

Greene 1997 – Snakes: the Evolution of mystery in nature.



Lachesis muta. Foto: Otávio A. V. Marques

1 INTRODUÇÃO

As serpentes são animais extremamente diferenciados, filogeneticamente complexos e amplamente distribuídos geograficamente, presentes em todos os continentes do mundo com exceção apenas das regiões polares e da Groenlândia (GREENE, 1997; UETZ; HOSEK, 2014). A ampla diversidade filogenética e biogeográfica confere às serpentes diferenças significativas no modo de vida de cada espécie, ocasionando em uma história de vida rica entre espécies e populações em termos de alimentação, reprodução e demais aspectos de história natural (SHINE; BONNET, 2009).

Dentre todas as vertentes que moldam a história de vida das espécies, certamente a reprodução é uma das características mais intrigantes. Os organismos buscam otimizar sua aptidão biológica selecionando a melhor estratégia reprodutiva em determinado ambiente, o que possibilita o sucesso reprodutivo da espécie e sua continuidade ao longo da história evolutiva. O conjunto de características manifestadas por uma espécie que levam ao sucesso reprodutivo pode ser chamado de estratégias reprodutivas (VAZZOLER, 1996). Essas características incluem, por exemplo, o período reprodutivo, o modo reprodutivo, a sincronia reprodutiva entre machos e fêmeas, a época de fecundação e a frequência reprodutiva (SEIGEL; FORD, 1987; SHINE, 2003). Os custos e os benefícios que permeiam a reprodução impõem uma forte seleção no ajuste de tais estratégias às condições ambientais locais e, como consequência, espécies e até populações podem apresentar estratégias reprodutivas bem distintas entre si (SHINE, 2003).

Em uma mesma população, por exemplo, diversos estudos demonstram significativo dimorfismo sexual entre machos e fêmeas, o que inclui o tamanho médio do corpo, tamanho relativo da cabeça e da cauda, coloração e aspectos ecológicos em geral (dieta, uso do habitat, nível de atividade e comportamento) (ALMEIDA-SANTOS et al., 2014; BONNET et al., 1998; KING, 1989; SHINE, 1993, 1994). O dimorfismo sexual pode tanto ser resultado de seleção sexual, em que machos maiores e mais robustos obteriam vantagens em rituais de combate com outros machos e na competição espermática, quanto decorrer de seleção natural, em que fêmeas maiores processam e estocam mais energia para a nutrição dos ovos ou embriões (BONNET et al., 1998; KING, 1989; SHINE, 1994). Diferenças corporais entre machos e fêmeas de serpentes são frequentemente relacionadas com diferenças em estratégias no sistema de acasalamento (SHINE, 1978). Nas espécies em que não ocorre ritual de combate entre machos, geralmente as fêmeas são maiores (SHINE, 1994). De fato, quando

olhamos para a família Viperidae, na grande maioria das espécies em que é confirmado o ritual de combate, machos são maiores do que as fêmeas, como é o caso de algumas espécies do gênero *Agkistrodon* (SHINE, 1994) e *Crotalus* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; SHINE, 1994). Já para os viperídeos neotropicais, principalmente do gênero *Bothrops*, observa-se uma inversão nos valores do índice do dimorfismo sexual, e fêmeas frequentemente são maiores do que os machos ao mesmo tempo em que o ritual de combate deixa de ser observado para a maioria das espécies desse grupo, e a fecundidade das fêmeas aumenta (ALMEIDA-SANTOS et al., 2017; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a, 2014b; HARTMANN; LEÃO et al., 2014; MARQUES; ALMEIDA-SANTOS, 2004; MARQUES; KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2013; MONTEIRO et al., 2006; SAZIMA, 1992; SOLÓRZANO; CERDAS, 1989; SILVA et al., 2019b; VALDUJO; NOGUEIRA; MARTINS, 2002).

Outra característica importante e bastante variável entre as serpentes são os ciclos reprodutivos, ou seja, o padrão de atividade das gônadas dos indivíduos ao longo da estação reprodutiva. De acordo com Mathies (2011), os ciclos reprodutivos podem ser classificados tanto em nível individual quanto em nível populacional. Em nível individual, o tipo reprodutivo é classificado seguindo três padrões distintos: descontínuo cíclico, quando as gônadas ficam quiescentes por algum período; contínuo cíclico, quando as gônadas não ficam completamente quiescentes, mas sua atividade é reduzida por algum período; e acíclico, quando as gônadas exibem níveis constantes de atividade ao longo do ano. Em nível populacional, o ciclo reprodutivo pode ser classificado como sazonal, quando os indivíduos da população apresentam sincronia nos eventos reprodutivos; ou assazonal, quando não há sincronia.

Diversos fatores associados (utilização do habitat, alimentação, temperatura, umidade e fotoperíodo) podem influenciar a extensão do ciclo reprodutivo (MATHIES, 2011) (SEIGEL; FORD, 1987). Muitas espécies de Colubridae da América do Norte, região temperada, apresentam o período de vitelogênese e cópula restritos ao período de primavera (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; MATHIES, 2011(ALDRIDGE, 1979). Por outro lado, crotalíneos norte-americanos sincronizam o início da vitelogênese com as estações de verão e outono, no inverno o processo cessa por um período de hibernação e é finalizado na primavera, quando ocorre a ovulação e a fertilização, seguido do nascimento dos filhotes no verão até início do outono, demonstrando uma marcada sazonalidade reprodutiva que coincide com épocas mais quentes do ano (ALDRIDGE, 1979; ALDRIDGE; DUVALL, 2002; SEIGEL; HUGGINS; FORD, 1987). Nas regiões tropicais e subtropicais, é possível

encontrar espécies capazes de se reproduzir continuamente ao longo de todo o ano (MATHIES, 2011). Entretanto, a frequência dessas espécies é muito menor do que o esperado por alguns autores (FITCH, 1982), e parte considerável das espécies tropicais já estudadas apresenta ciclo sazonal, como é o caso dos crotalíneos (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; ALMEIDA-SANTOS et al., 2017; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; MARQUES, 1996; NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003; SHINE, 2003). Isto deve ocorrer devido a restrições filogenéticas, fator influente na reprodução de serpentes cuja importância ainda é pouco quantificada (BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a; BELLINI; ARZAMENDIA; GIRAUDO, 2017; PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS; MARQUES, 2006), e aos custos energéticos dos eventos reprodutivos (SEIGEL; HUGGINS; FORD, 1987).

Existem 32 espécies da Família Viperidae descritas para o território brasileiro, sendo 2 do gênero *Bothrocophias*, 28 do gênero *Bothrops*, 1 do gênero *Crotalus* e 1 do gênero *Lachesis* (COSTA; BÉRNILS, 2018), e são conhecidas popularmente como jararacas (*Bothrops* e *Bothrocophias*), cascavéis (*Crotalus*) e surucucu (*Lachesis*). Vários aspectos biológicos são conhecidos para muitas delas, já que são animais peçonhentos e de importância médica (ALENCAR et al., 2016; GREENE, 1997).

Em relação à biologia reprodutiva, os viperídeos brasileiros estudados são: *Bothrops erythromelas* (BARROS, 2011), *B. insularis* (KASPEROVICZUS, 2013), *B. jararaca* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; KASPEROVICZUS, 2013) *B. leucurus* (BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014b), *B. matogrossensis* (MONTEIRO et al., 2006), *B. moojeni* (ALMEIDA-SANTOS et al., 2017; NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003), *B. pauloensis* (VALDUJO; NOGUEIRA; MARTINS, 2002), *B. alternatus* (NUNES et al., 2010; AMARAL, 2015), *B. atrox* (SILVA et al., 2019a) e *Crotalus durissus* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; SUEIRO, 2013). Nas espécies do gênero *Bothrops*, fêmeas e machos apresentam ciclos reprodutivos descontínuos e sazonais, e mostram algumas características reprodutivas conservadas em relação aos crotalíneos de regiões temperadas, como o nascimento dos filhotes no verão e início de outono, e outras características distintas, como período de cópula no outono/inverno (SEIGEL; FORD, 1987; SHINE, 1977b).

Algumas estratégias reprodutivas adotadas por muitas espécies do gênero *Bothrops* são similares ao descrito para algumas espécies de *Crotalus* no que diz respeito à presença obrigatória de estocagem de espermatozoides, à presença do UMT (*uterine muscular twisting*) e à fertilização tardia, ou seja, dissociada do período de cópula (ALMEIDA-SANTOS;

SALOMÃO, 2002; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012). A UMT é uma mudança morfológica que ocorre na região posterior do útero, em uma região também denominada junção útero-vaginal (MUNIZ-DA-SILVA et al., 2018). Essa modificação pode estar relacionada com a estocagem de espermatozoides, pois gera uma obstrução na região, dificultando a passagem de espermatozoides para o útero anterior por um determinado tempo (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002). Apesar de ser comum observar essa estrutura em viperídeos do gênero *Bothrops* e *Crotalus*, ainda não há relatos na literatura para o gênero *Lachesis*. Estas características reprodutivas conservadas e atribuídas à maioria das espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* vem sendo relacionadas com a inércia filogenética (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014b).

O gênero *Lachesis* Daudin 1803 compreende quatro espécies restritas às florestas úmidas da América Central e América do Sul (VIAL; JIMENEZ-PORRAS, 1967) e são conhecidas popularmente como surucucu ou surucucu-pico-de-jaca, devido à textura de suas escamas. *Lachesis stenophrys* Cope, 1876, é encontrada do sul da Nicarágua até a região central e oeste do Panamá (CAMPBELL; LAMAR, 2004) e a costa Atlântica da Costa Rica (CORRALES et al., 2014); *L. melanocephala* Solórzano e Cerdas, 1986, é restrita ao sudoeste da Costa Rica até a fronteira com o Panamá (CAMPBELL; LAMAR, 2004); *L. acrochorda* (García, 1896), é distribuída ao longo das duas faixas costeiras do Panamá e ainda na região norte da Colômbia até o noroeste do Equador (FUENTES; CORRALES, 2016). A espécie *Lachesis muta* (Linnaeus, 1766) é a de maior distribuição e ocorre na América do Sul. No Brasil são encontradas duas populações que ocupam biomas distintos, uma na região norte da Mata Atlântica, do Ceará ao Rio de Janeiro, e outra na Floresta Amazônica, no Amapá, Amazonas, Acre, Pará, Rondônia, Roraima, Mato Grosso e Goiás (CAMPBELL; LAMAR, 2004). Estudos de filogenia e taxonomia sugerem que *L. muta* é independente das demais espécies, formando um grupo monofilético (FERNANDES; FRANCO; FERNANDES, 2004; ZAMUDIO; GREENE, 1997).

Lachesis são serpentes de hábito noturno e que se alimentam de pequenos mamíferos, principalmente roedores do gênero *Oryzomys* sp. e ratos-de-espinho do gênero *Proechimys* sp., o que faz com que alguns autores caracterizem essas serpentes como predadoras seletivas, ou especialistas (GREENE; SANTANA, 1983; GREENE, 1997; RIPA, 1999; CAMPBELL; LAMAR, 2004; TURNER; CARMICHAEL; SOUZA, 2008). Exceto, talvez, por *Bothrocophias colombianus* (CAMPBELL; LAMAR, 2004), *Lachesis* é o único viperídeo ovíparo neotropical, fato que a diferencia dos outros crotalíneos neotropicais (AMARAL, 1925). Estas serpentes depositam seus ovos em buracos de troncos caídos, ou deixados por

mamíferos, e utilizam esses locais como refúgio (CAMPBELL; LAMAR, 2004; DE SOUZA, 2007; GREENE, 1997; MOLE, 1924; RIPA, 1994). Estudos de biologia reprodutiva para as espécies de *Lachesis* foram desenvolvidos majoritariamente em cativeiro (CORRALES et al., 2014; RIPA, 1994; RIPA, 2002). Para as espécies da América Central, os autores relatam pela primeira vez o dimorfismo sexual (machos maiores do que fêmeas) e aspectos de comportamento reprodutivo, como o cuidado parental, o combate entre machos e o comportamento de corte. Sobre *L. muta*, estudos com foco em reprodução (BOYER; MITCHELL; MURPHY, 1989; CORRALES; GÓMEZ; FLORES, 2016; DE SOUZA, 2007; EISELE, 2009; MELGAREJO; CUNHA; AGUIAR, 1999) foram também delineados em cativeiro e descrevem cuidado parental, comportamento de corte e número médio de ovos por ninhada.

Os autores citados acima relatam aspectos convergentes em relação ao ciclo reprodutivo da surucucu. De Souza (2007), ao estudar uma população do sul da Bahia em cativeiro, afirmou não existir estação reprodutiva definida para *Lachesis muta*, sugerindo que a população seria capaz de se reproduzir continuamente ao longo do ano desde que ocorram frentes frias ou aumento na frequência das chuvas. O mesmo fato também foi observado por Boyer et al. (1989) e por Corrales (2016), que sugerem a simulação de uma frente fria e o aumento da umidade do cativeiro para desencadear os eventos reprodutivos em *L. muta*. Por outro lado, Alves et al. (2014), ao analisar a atividade gonadal de machos e fêmeas em diferentes estações do ano de uma população de *L. muta* do sul da Bahia afirmaram existir sazonalidade em alguns eventos reprodutivos, como a espermatogênese dos machos.

Controvérsias quanto à sazonalidade ou não dos eventos reprodutivos desconsideram aspectos ambientais ou influências do cativeiro. Estas lacunas estimulam novos estudos que considerem, não apenas dados comportamentais, mas também uma análise mais robusta e criteriosa do trato reprodutivo de machos e fêmeas de *Lachesis muta*. Além disso, a biologia reprodutiva da população da Floresta Amazônica permanece desconhecida. Nesse sentido, este trabalho tem o objetivo de descrever a biologia reprodutiva das duas populações de *L. muta* que ocorrem no Brasil através da análise histológica das gônadas de indivíduos coletados na natureza e preservados em coleções zoológicas. Com isso, buscamos responder as seguintes questões: 1) O ciclo reprodutivo da surucucu é conservado em relação aos demais crotalíneos neotropicais? Isto é, apresenta sazonalidade na atividade gonadal, estratégia de estocagem de espermatozoide e contração muscular uterina (UMT). 2) Influências climáticas são capazes de culminar em diferenças nas estratégias reprodutivas entre as duas populações de *L. muta* encontradas no Brasil?

Além do interesse inerente ao conhecimento da reprodução da espécie, *Lachesis muta* também sofre com a perda de habitat devido a destruição predatória de seu ecossistema exclusivo, e a população da Mata Atlântica já foi elencada vulnerável (ALVES; ARGÔLO; CARVALHO, 2014). Assim, o conhecimento sobre a biologia reprodutiva é importante para a definição de estratégias de conservação para a espécie (ALMEIDA-SANTOS et al., 2014).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Os animais

Foram utilizados espécimes de *Lachesis muta*, machos e fêmeas, fixados em coleções herpetológicas e museus zoológicos. Os animais examinados estão depositados nas coleções das seguintes instituições: Instituto Butantan, SP (IBUSP), Museu de Zoologia da USP, SP (MZUSP), Museu Paraense Emílio Goeldi, PA (MPEG), Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, AM (FMT-HVD), e Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz, BA (MZUESC) totalizando 270 indivíduos, 125 da Floresta Amazônica (FA) e 145 do norte da Mata Atlântica (MA) (Tabela 1.1). De todos os espécimes foram coletados dados de procedência e data de coleta/óbito para inferir o padrão de atividade dos indivíduos coletados. A Figura 1.1 mostra as localidades de todos os animais avaliados neste trabalho.

Tabela 1.1 – Número total de indivíduos analisados no trabalho e separados por bioma.

	Machos	Fêmeas	Filhotes/Juvenis
Floresta Amazônica	57	41	27
Mata Atlântica	56	54	35

2.2 Área de estudo

2.2.1 Floresta Amazônica (FA)

As áreas localizadas dentro do bioma Amazônico compreendem os Estados do Amazonas, Acre, Rondônia, Roraima, Pará, Amapá, e partes do Maranhão, Mato Grosso e Tocantins. O clima predominante nessa região é o equatorial (MENDONÇA & DANNI-

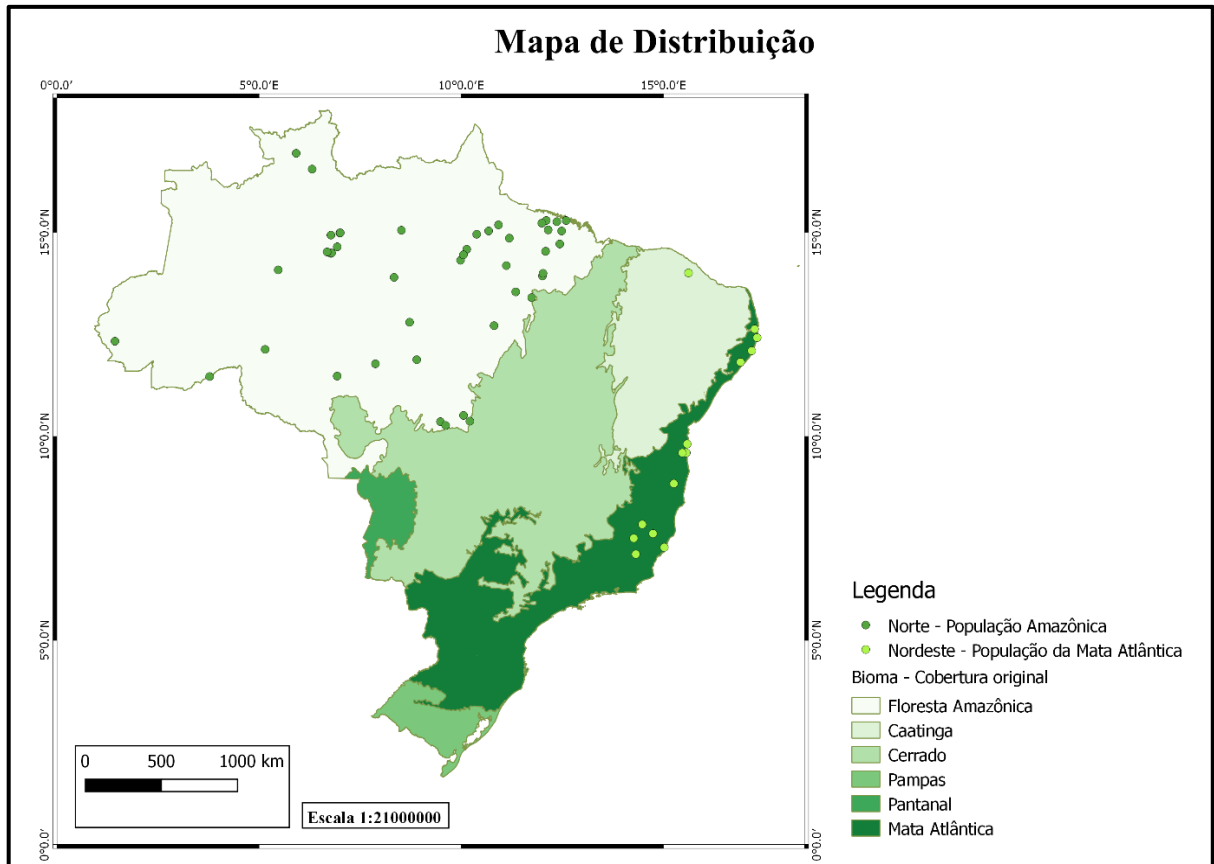
OLIVEIRA, 2007), com temperaturas médias relativamente constantes ao longo do ano (24°C e 26°C). Nos meses de junho a agosto, a temperatura apresenta uma pequena queda devido à penetração de frentes frias.

Em relação à pluviosidade, na região amazônica encontram-se os mais expressivos totais pluviométricos do país em uma distribuição heterogênea, tanto espacial quanto temporal (MENDONÇA; DANNI-OLIVEIRA, 2007). Tal característica permite identificar os subtipos climáticos da zona equatorial amazônica. Climatogramas para as principais regiões amostradas foram elaborados a partir de dados do WorldClim versão 2.0, entre os anos de 1970 e 2018 (Figura 1.2).

2.2.2 Mata Atlântica (MA)

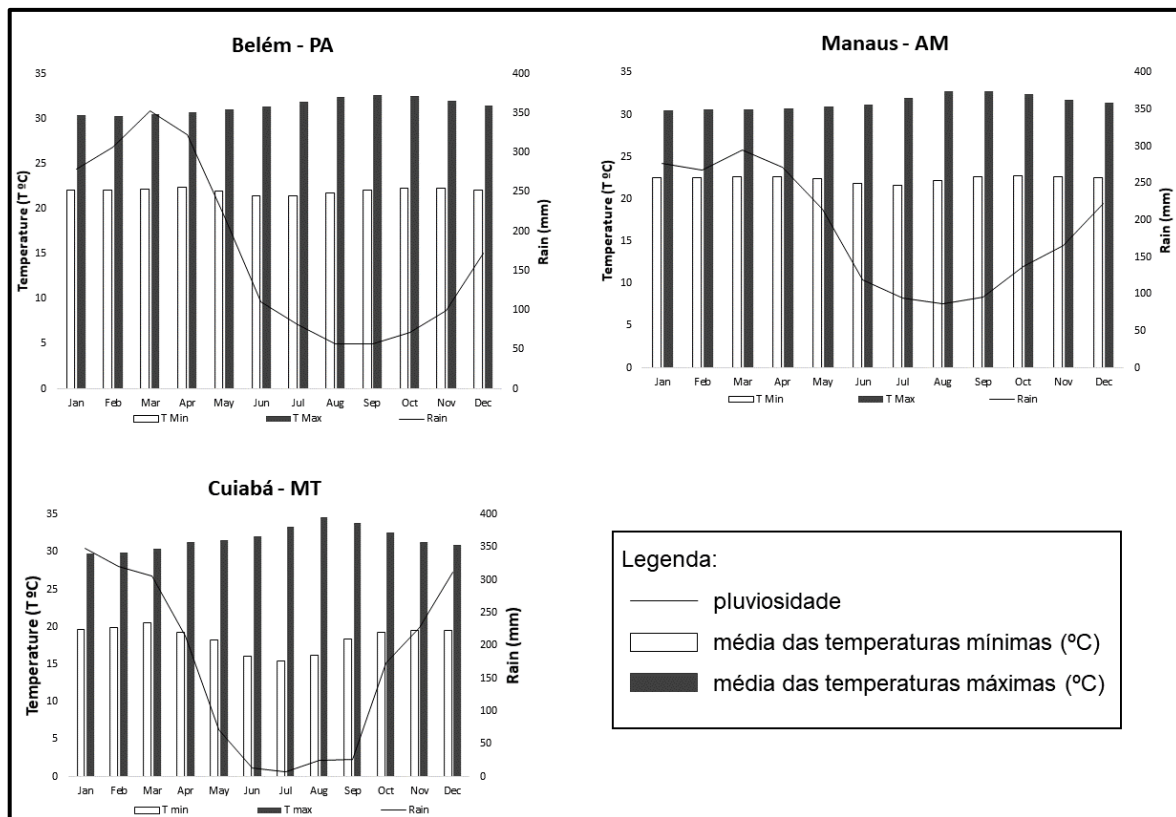
Nas áreas de Mata Atlântica onde a espécie em estudo ocorre, o clima é tropical úmido e quente, ou tropical litorâneo (MENDONÇA; DANNI-OLIVEIRA, 2007), influenciado pelas massas de ar úmidas provenientes do oceano Atlântico. Apresenta maior amplitude térmica e maior variação pluviométrica ao longo do ano quando comparado com o bioma Amazônico. A concentração de chuvas se dá principalmente no final do verão até o inverno, e a temperatura apresenta uma pequena queda nos meses de inverno (MENDONÇA; DANNI-OLIVEIRA, 2007). Climatogramas para essas regiões são apresentados na Figura 1.3.

Figura 1.1 – Mapa da distribuição dos animais estudados neste trabalho.



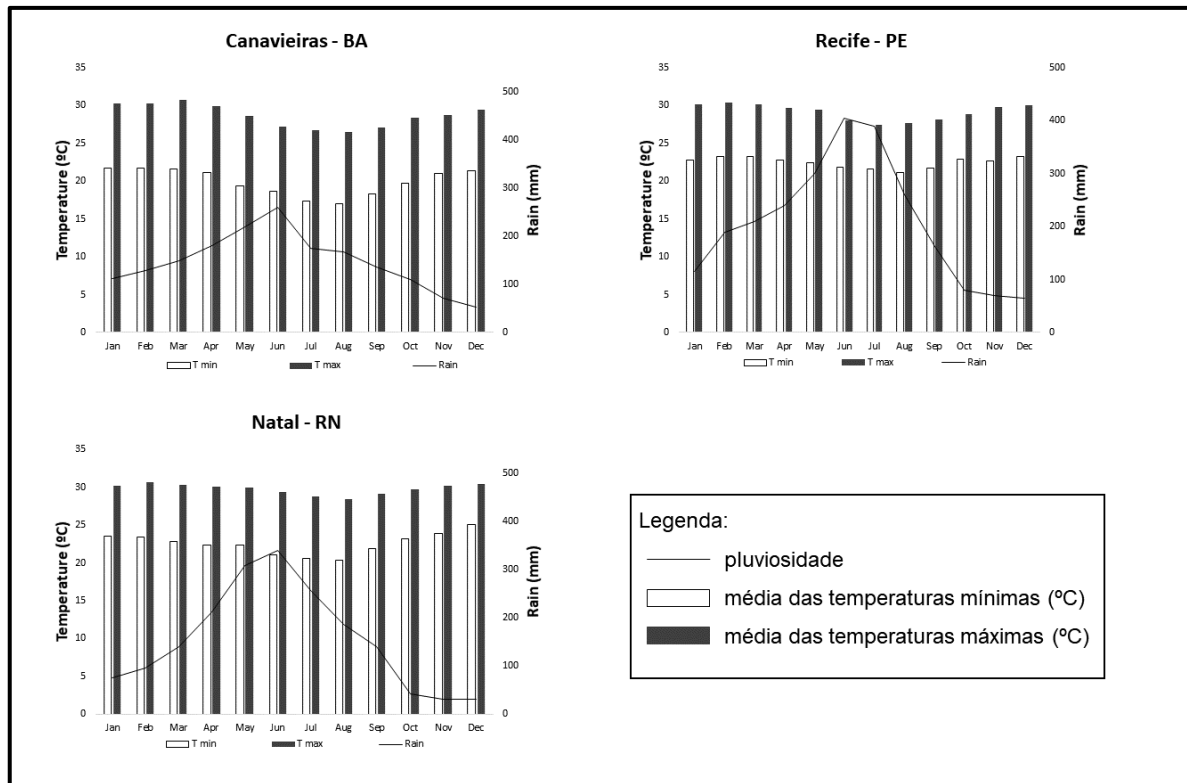
FONTE: SOUZA, E. 2020

Figura 1.2 – Climatogramas de três cidades da região amazônica, representando o padrão para a área da Floresta Amazônica. Média anual da precipitação, temperatura mínima e temperatura máxima de três cidades.



Fonte: SOUZA, E. 2020

Figura 1.3 – Climatogramas de três cidades do litoral nordestino, representando o padrão para a área do norte da Mata Atlântica. Média anual da precipitação, temperatura mínima e temperatura máxima de três cidades.



Fonte: SOUZA, E. 2020

2.3 Análise do dimorfismo e maturidade sexual

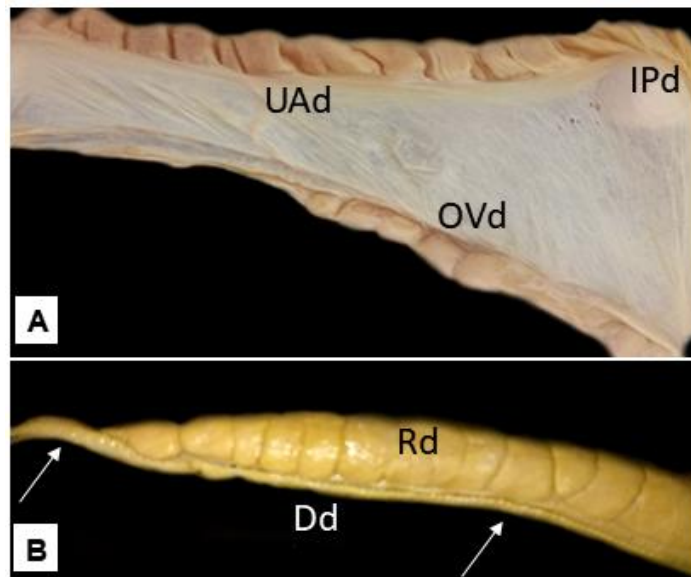
A maturidade sexual da fêmea foi inferida a partir da observação de folículos em vitelogênese secundária, ovos, oviduto distendido (ALMEIDA-SANTOS et al., 2014) (SHINE, 1977a) (Figura 1.4A), presença de contração muscular uterina (UMT – *uterine muscular twisting*), ou pela presença de espermatozoides no trato reprodutivo após análise histológica. Nos machos, a maturidade foi averiguada a partir da observação do menor indivíduo com ductos deferentes opacos e envelados (SHINE, 1977a) e, após análise histológica, a partir da presença de espermatozoides nos ductos e/ou nos testículos (Figura 1.4B).

Para a análise do dimorfismo sexual, foram coletados dados morfométricos de indivíduos machos e fêmeas adultos de *Lachesis muta* a fim de evitar variações ontogenéticas na forma do corpo (KING, 1989). As medidas coletadas foram: (1) Comprimento rostro-cloacal (CRC; com fita milimetrada precisão 0,5 mm); (2) Comprimento da cauda (CC; com fita milimetrada precisão 0,5 mm); (3) Comprimento da cabeça (CCAB; com paquímetro

digital precisão 0,1 mm); e (4) Largura da cabeça (LCAB, com paquímetro digital precisão 0,1 mm).

Para comparar o índice de dimorfismo sexual (SSD) foi utilizada a fórmula proposta por Shine (1994): $SSD = 1 - (\text{CRC médio dos adultos do sexo de maior tamanho} / \text{CRC médio dos adultos do sexo de menor tamanho})$. O SSD é um valor arbitrário e, quando expresso como negativo, indicam machos maiores do que fêmeas, enquanto valores positivos indicam fêmeas maiores do que machos.

Figura 1.4 – Maturidade sexual em fêmeas (A) e machos (B). A) Fêmea madura em vitelogenese primária e com oviduto distendido. B) Macho maduro com ductos deferentes opacos e enveloados. Legenda: UAd = útero aglandular direito; IPd = infundíbulo posterior direito; OVd = ovário direito; Rd = rim direito; Dd = ducto deferente direito. As setas apontam o ducto enveloadado.



Fonte: SOUZA, E. 2020

2.4 Caracterização do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de *Lachesis muta*

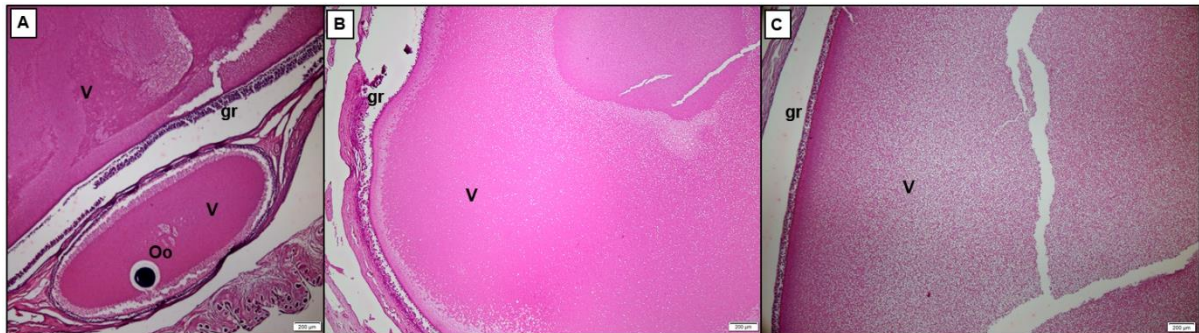
Uma incisão longitudinal ventral acima da cloaca até dois terços do comprimento total do animal foi feita para estudo da anatomia macroscópica e microscópica do trato reprodutivo dos animais com a análise dos dados de acordo com Almeida-Santos et al. 2014. As medidas macroscópicas foram dadas em milímetros com auxílio de paquímetro digital precisão 0,1 mm.

Para todas as fêmeas foram registrados os seguintes dados: (1) estágio folicular (vitelogenese primária ou vitelogenese secundária), (2) quantidade de folículos em

vitelogenese secundária (V2) ou ovos nos ovidutos, (3) o comprimento do maior folículo ovariano ou ovo, e (4) a presença/ausência da UMT. Para todos os machos foram registrados (1) o comprimento, a largura e a espessura dos testículos direito e esquerdo; (2) o aspecto dos ductos deferentes (opaco e enovelado ou liso e translúcido); e (3) o diâmetro dos ductos deferentes direito e esquerdo na região distal. Para o cálculo do volume testicular foi utilizada a fórmula: $VT = 4/3 \pi abc$, onde $a = 1/2$ comprimento do testículo, $b = 1/2$ largura e $c = 1/2$ espessura (SHINE, 1980). O volume testicular foi usado como indicador da atividade espermatogênica (FOX, 1956; SHINE, 1977a; VOLSØE, 1944).

É comum que folículos maiores de 10 mm sejam considerados folículos vitelogênicos (ALMEIDA-SANTOS et al., 2014). Entretanto, para a surucucu, os folículos de 10 mm eram não-vitelogênicos, uma vez que não foi possível identificar depósito de vitelo nesses folículos em análise histológica (Figura 1.5 A e B). Sendo assim, folículos acima de 15 mm foram considerados vitelogênicos (Figura 1.5 C), quando o depósito de vitelo foi aparente no início da vitelogenese secundária, representado pela presença de gordura, que não fixa corretamente na lâmina e, portanto, não reage à hematoxilina-eosina.

Figura 1.5 – Folículos de *L. muta*. Corte longitudinal. Hematoxilina e Eosina. Aumento 4x. A) Folículos em V1; 10,82 mm; B) Folículo em V1 com início de deposição de vitelo; 11,32 mm; C) Folículo em V2, 15,73 mm. Gr = granulosa; Oo = oócito; V = vitelo.



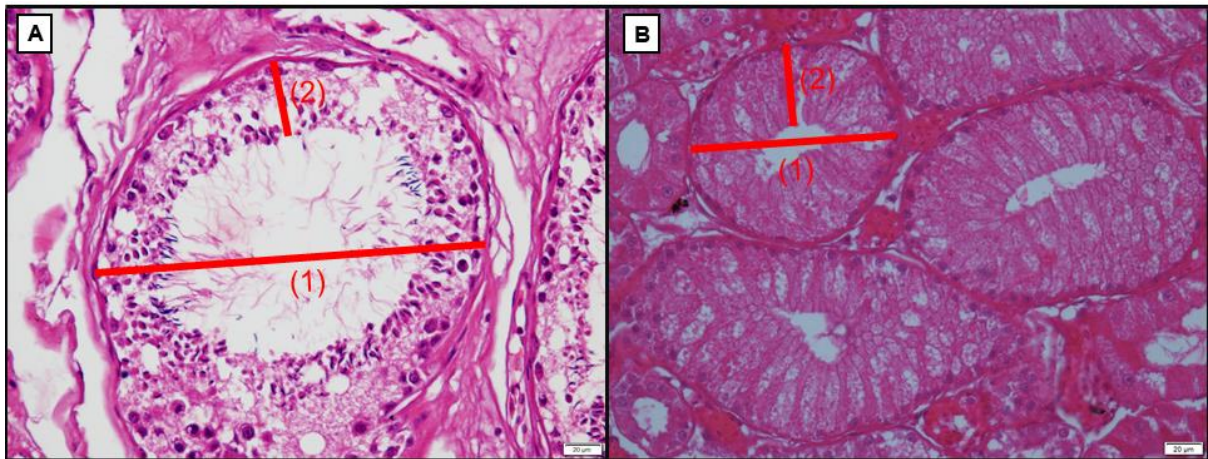
Fonte: SOUZA, E. 2020

2.4.1 Histologia do trato reprodutivo masculino e feminino

Foram coletadas amostras de tecido de machos e fêmeas para estudo em microscopia óptica. Nos machos foram coletados: um fragmento do testículo direito, um fragmento da região distal do ducto deferente e um fragmento do rim direito. As estruturas microscópicas medidas foram: diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio seminífero nos cortes de testículo (Figura 1.6A) e diâmetro dos túbulos e altura do epitélio dos segmentos sexuais

renais (Figura 1.6B; SSK - *Sexual Segment of the Kidney*), na finalidade de quantificar a variação destas estruturas ao longo das estações e caracterizar as fases espermatogênicas em diferentes épocas do ano de acordo com o Quadro 1.1.

Figura 1.6 – Medidas registradas para os machos em corte histológico. Hematoxilina e eosina, 40x. A) Túbulo seminífero em corte longitudinal do testículo, (1) = diâmetro do túbulo seminífero, (2) = altura do epitélio do túbulo seminífero. B) Segmento sexual renal (SSR) em corte longitudinal do rim, (1) = diâmetro do SSR, (2) = altura do epitélio do SSR.



Fonte: SOUZA, E. 2020

Quadro 1.1 – Classificação dos túbulos seminíferos nas fases espermatogênicas.

Estágio	Descrição do túbulo seminífero
1	Regressão completa: túbulos revestidos apenas por espermatogônias e células de Sertoli; ocorrência ocasional de poucos espermatozoides no lúmen.
2	Início da espermiogênese: Espermatogônias aumentando e dividindo-se; presença de espermatócitos primários.
3	Espermiogênese: Espermátides em metamorfose e presença de poucos espermatozoides.
4	Espermiacão: espermatozoides maduros no lúmen.
5	Final da Espermiacão: Espermatócitos e espermátides diminuindo. Espermatozoides ainda abundantes.
6	Início da regressão: Epitélio germinativo reduzido, espermatogônias, espermatócitos e espermátides. Pode haver espermatozoides no lúmen.

Fonte: Adaptado de (GOLDBERG; PARKER, 1975; KASPEROVICZUS, 2013; SAINT-GIRONS, 1982; SILVA, 2015)

Nas fêmeas foram coletados: um fragmento do infundíbulo posterior e um da região da UMT e da vagina na finalidade de verificar estruturas de estocagem de espermatozoide e/ou plug copulatório.

Os fragmentos de tecido coletados, previamente fixados em formol 10% e mantidos em solução etanol 70%, foram submetidos a desidratação em série crescente de etanol (80%, 90% e 100%) e diafanizados em xilol fracionado e xilol puro, seguido de inclusão em parafina. Os cortes de 5 µm de espessura foram feitos com micrótomo e em seguida submetidos à coloração básica com hematoxilina-eosina.

2.5 Análises dos dados

Os dados foram analisados de acordo com Zar (1999), utilizando-se teste paramétrico ou o equivalente não paramétrico dependendo da normalidade e homogeneidade das amostras. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Devido à relativa homogeneidade na variação de temperatura ao longo do ano e à expressiva variação pluviométrica na região da Floresta Amazônica (FA), foram definidas duas estações a fim de possibilitar comparação estatística na sazonalidade dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas: a estação seca, de maio até outubro, e a estação chuvosa, de novembro até abril. Já para a região da Mata Atlântica (MA), onde existe tanto variação de temperatura quanto pluviométrica ao longo do ano, foram definidas quatro estações: verão (janeiro, fevereiro e março), outono (abril, maio e junho), inverno (julho, agosto e setembro) e primavera (outubro, novembro e dezembro).

Para inferência do padrão de atividade a partir da data de coleta dos animais, foi empregada a análise do Qui-quadrado de Pearson para verificar a probabilidade de casualidade na distribuição dos indivíduos em diferentes bimestres do ano. O dimorfismo sexual foi verificado a partir de teste-t na comparação do comprimento rostro-cloacal (CRC) médio de machos e fêmeas. Para o comprimento da cauda, da cabeça e largura da cabeça, foi utilizado análise de covariância (ANCOVA), usando o CRC como covariável.

Para a população da FA, comparamos as medidas da variação do volume testicular e o diâmetro do ducto deferente por teste-t, uma vez que o tamanho dos órgãos não mostrou correlação com o CRC dos indivíduos. Já para o comprimento do testículo, avaliamos por análise de covariância, usando o CRC como covariável. Para a população da MA essas medidas não estão disponíveis pois a maioria dos animais estavam sem uma parte do testículo direito e/ou esquerdo devido a estudos anteriores.

O teste-t também foi utilizado para avaliar a variação nas medidas microscópicas do túbulo seminífero do testículo. A variação nas medidas do segmento sexual renal (SSR) foram comparadas pelo teste de Mann Whitney Wilcoxon, equivalente não paramétrico do teste-t. No caso dos machos da população amazônica, o número amostral permitiu testar a variação das medidas microscópicas levando em consideração dois períodos para cada estação: final da estação chuvosa (FEC: fevereiro, março, abril), início da estação seca (IES: maio, junho, julho), final da estação seca (FES: agosto, setembro, outubro), e início da estação chuvosa (IEC: novembro, dezembro, janeiro). Nesse caso os testes foram feitos com análise de variância (ANOVA) para o túbulo seminífero do testículo, e teste não paramétrico de Kruskal Wallis para o SSR. Análises estatísticas e gráficos foram elaborados no software RStudio ou no Microsoft Excel.

A fecundidade foi inferida pela contagem do número de folículos em vitelogênese secundária ou ovos no útero de fêmeas reprodutivas. Primeiro, fizemos um teste de regressão entre o comprimento rostro-cloacal da mãe e a fecundidade, entre o comprimento total materno e a fecundidade, e entre o diâmetro do maior ovo ou folículo e o comprimento rostro-cloacal materno utilizando os dados de 10 fêmeas analisadas neste trabalho, sendo duas da FA e oito da MA. Em um segundo momento, os mesmos testes foram repetidos acrescentando-se dados de mais quatro fêmeas provenientes da literatura. Não comparamos a fecundidade entre as duas localidades devido ao baixo número amostral de fêmeas em V2 ou prenhes na região da Floresta Amazônica.

O ciclo reprodutivo das fêmeas foi elaborado a partir da análise da distribuição dos folículos e/ou ovos ao longo do ano. O período de cópula foi estimado a partir da observação de espermatozoides e/ou plug copulatório em análises histológicas da vagina, e da época de maior concentração de fêmeas em vitelogênese secundária (ALMEIDA-SANTOS et al., 2014). De acordo com dados da literatura (ALVES; ARGÔLO; CARVALHO, 2014; BOYER; MITCHELL; MURPHY, 1989; CORRALES; GÓMEZ; FLORES, 2016; DE SOUZA, 2007), o comprimento total dos filhotes ao nascer varia de 40 a 61 cm aproximadamente. Portanto, exemplares da amostra que apresentavam comprimento entre esses valores foram considerados filhotes recém-nascidos. Juvenis com mais de 12 meses de vida apresentaram tamanho médio de 122 cm (BOYER; MITCHELL; MURPHY, 1989), portanto, exemplares de comprimento entre 61 cm e 122 cm foram considerados juvenis em primeiro ano de vida.

Fotografias foram feitas no Microscópio Olympus BX 51, acoplado a câmera digital Olympus DP73. As medidas microscópicas foram feitas utilizando o software de imagem

cellSens, em aumento 20x. O preparo histológico foi feito no laboratório particular VETPAT Patologia e Biologia Molecular Veterinária, no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan e no Laboratório de Citogenética do Instituto Butantan. As fotografias foram feitas no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

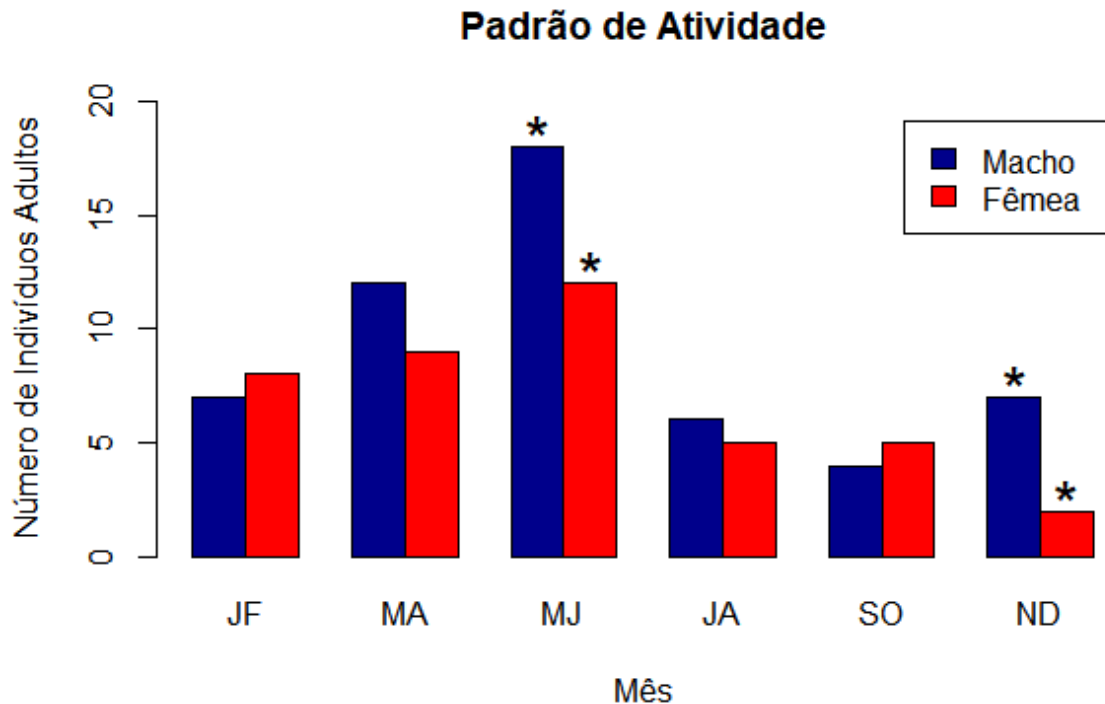
3 RESULTADOS

3.1 Inferência do padrão de atividade a partir dos animais coletados

3.1.1 População Amazônica

Foi avaliado um total de 95 indivíduos adultos, sendo 54 machos e 41 fêmeas. No caso dos machos, o número de animais coletados no bimestre de maio/junho foi significativamente superior ao restante do ano (Figura 1.6), ou seja, ao bimestre de julho/agosto ($X^2 = 14,6$; $gL = 5$; $p = 0,0143$), setembro/outubro ($p = 0,0028$), novembro/dezembro e janeiro/fevereiro ($p = 0,0278$). Em relação às fêmeas, o número de animais coletados no bimestre de março/abril e de maio/junho foi significativamente superior ao bimestre de novembro/dezembro ($X^2 = 9,1951$, $gL = 5$; $p = 0,0348$ e $p = 0,0075$, respectivamente; Figura 1.7).

Figura 1.7 – Número de indivíduos adultos de *Lachesis muta* da Amazônia coletados ao longo dos anos. O eixo x representa os bimestres: JF = janeiro/fevereiro; MA = março/abril; MJ = maio/junho; JÁ = julho/agosto; SO = setembro/outubro; ND = novembro/dezembro; o eixo y representa o número de indivíduos coletados por bimestre. Barras azuis = machos; barras vermelhas = fêmeas. Asterisco (*) = indica os bimestres com diferenças significativas tanto para machos quanto para fêmeas.

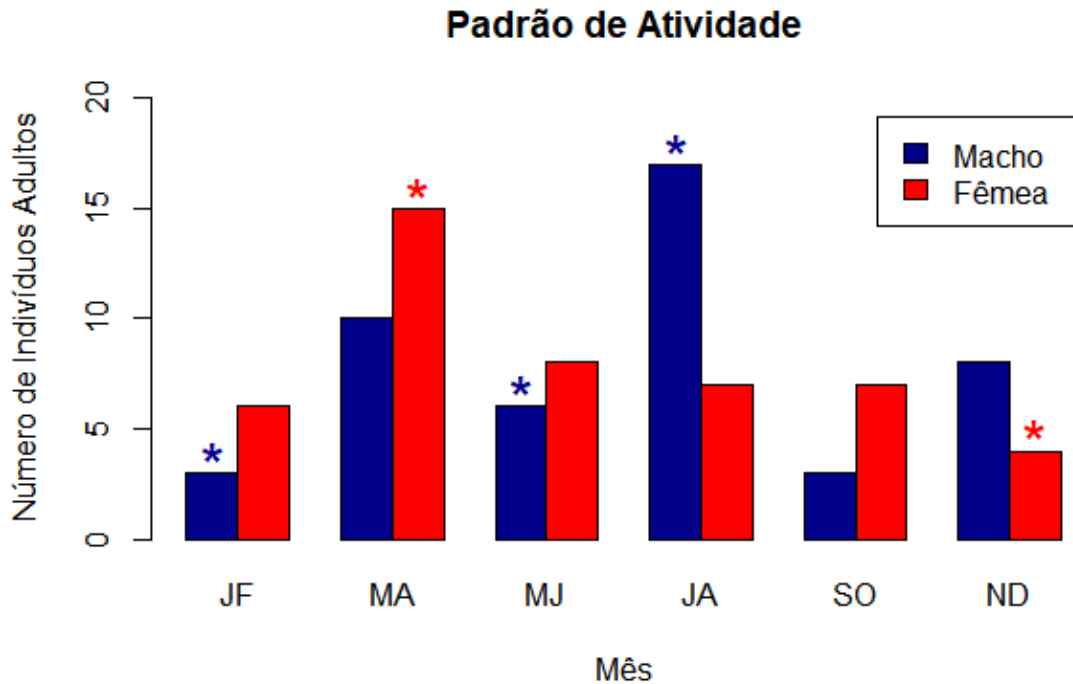


Fonte: SOUZA, E. 2020

3.1.2 População da Mata Atlântica

Foi avaliado um total de 94 indivíduos adultos, sendo 47 machos e 47 fêmeas. No caso dos machos, o número de animais coletados no bimestre de julho/agosto foi significativamente superior ao bimestre de maio/junho ($X^2 = 17,723$; $gL = 5$; $p = 0,0218$), e janeiro/fevereiro ($p = 0,0017$) (Figura 1.8). Em relação às fêmeas, o número de animais coletados no bimestre de março/abril foi significativamente superior ao bimestre de novembro/dezembro ($X^2 = 9,0426$, $gL = 5$; $p = 0,012$; Figura 1.8).

Figura 1.8 – Número de indivíduos adultos de *Lachesis muta* da Mata Atlântica coletados ao longo dos anos. O eixo x representa os bimestres: JF = janeiro/fevereiro; MA = março/abril; MJ = maio/junho; JA = julho/agosto; SO = setembro/outubro; ND = novembro/dezembro; o eixo y representa o número de indivíduos coletados por bimestre. Barras azuis = machos; barras vermelhas = fêmeas. Asterisco (*) = indica os bimestres com diferenças significativas entre machos (azul) e fêmeas (vermelho).



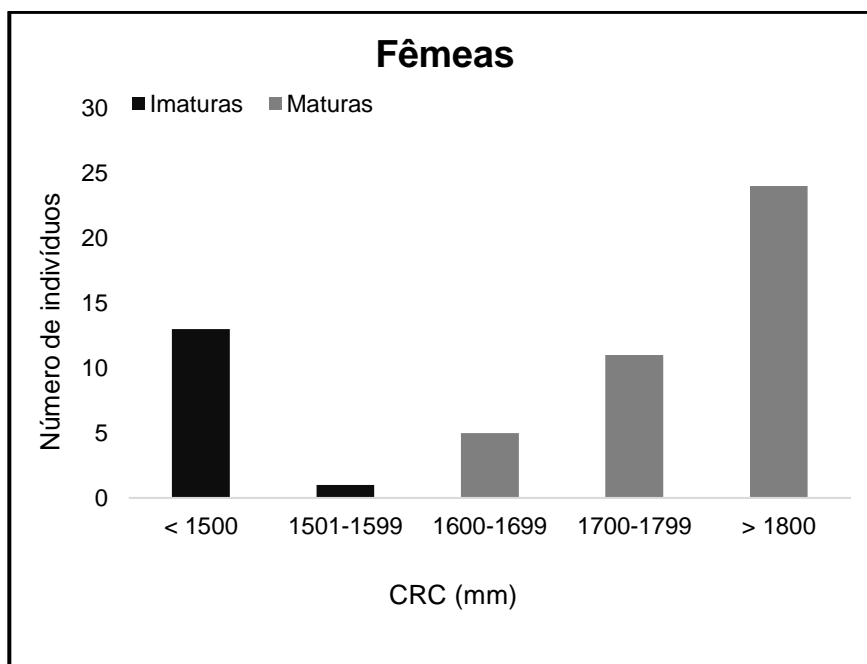
Fonte: SOUZA, E. 2020

3.2 Maturidade sexual

3.2.1 População Amazônica

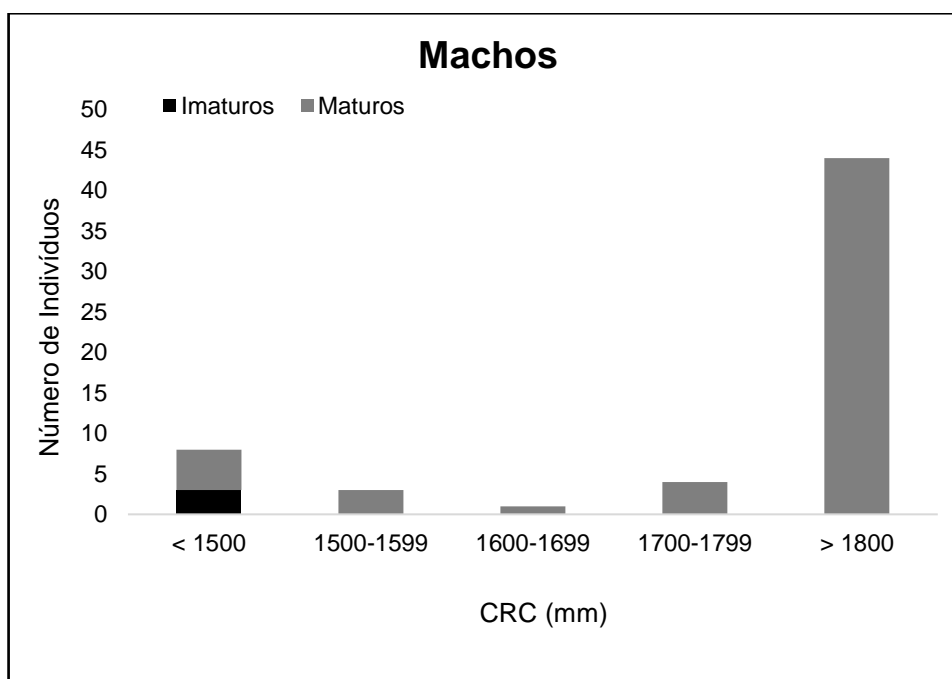
A menor fêmea sexualmente madura tinha 1640 mm de CRC (Figura 1.9), apresentando folículos em vitelogênese primária e útero anterior distendido. Em relação aos machos, o menor indivíduo sexualmente maduro tinha 1280 mm de CRC, no início da espermatogênese. No caso dos machos, foi verificado certa variação entre os indivíduos da população (Figura 1.10), isto é, alguns machos maiores de 1280 mm foram considerados imaturos.

Figura 1.9 – Número de fêmeas de *Lachesis muta* amostradas de acordo com a maturidade sexual - FA. O eixo x representa o comprimento rostro-cloacal em milímetros de todos os indivíduos amostrados; o eixo y representa o número de indivíduos. Barras escuras representam fêmeas imaturas e barras claras representam fêmeas maduras.



Fonte: SOUZA, E. 2020

Figura 1.10 – Número de machos de *Lachesis muta* amostrados de acordo com a maturidade sexual - FA. O eixo x representa o comprimento rostro-cloacal em milímetros de todos os indivíduos amostrados; o eixo y representa o número de indivíduos. Barras escuras representam machos imaturos e barras claras representam machos maduros.

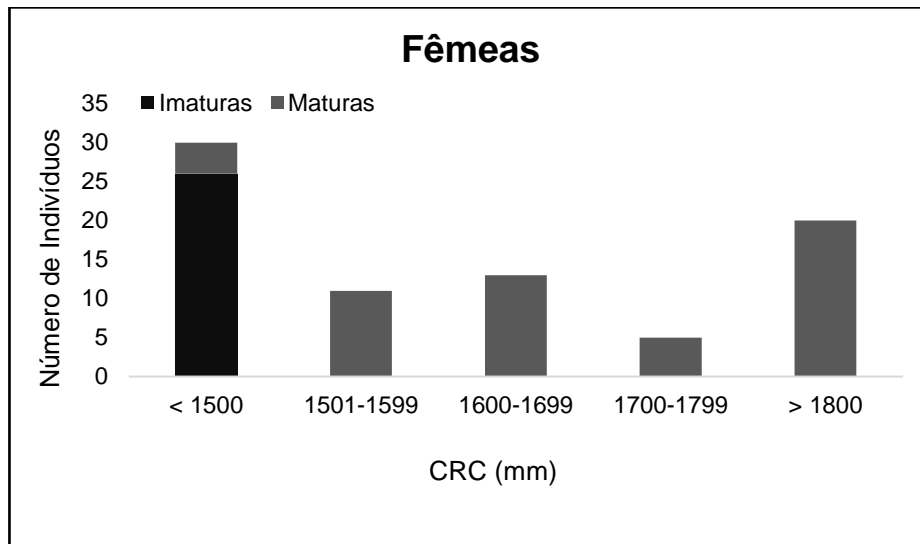


Fonte: SOUZA, E. 2020

3.2.2 População da Mata Atlântica

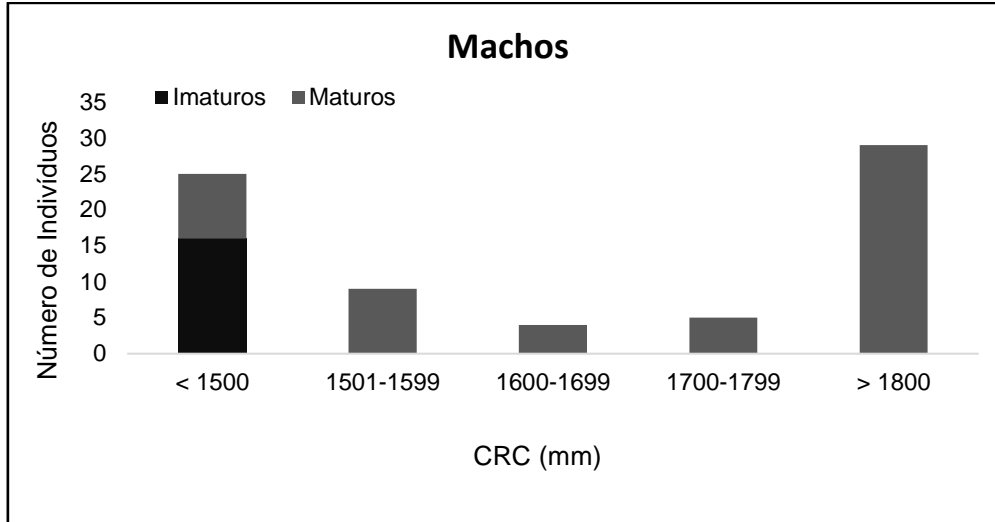
Observamos uma fêmea sexualmente madura com 1420 mm de CRC (Figura 1.11), apresentando vitelogênese primária e UMT bem desenvolvido, possivelmente em seu primeiro episódio reprodutivo. Em relação aos machos, o menor indivíduo sexualmente maduro tinha 1300 mm de CRC (Figura 1.12), apresentando ductos enovelados e opacos.

Figura 1.11 – Número de fêmeas de *Lachesis muta* amostradas de acordo com a maturidade sexual - MA. O eixo x representa o comprimento rostro-cloacal em milímetros de todos os indivíduos amostrados; o eixo y representa o número de indivíduos. Barras escuras representam fêmeas imaturas e barras claras representam fêmeas maduras.



Fonte: SOUZA, E. 2020

Figura 1.12 – Número de machos de *Lachesis muta* amostrados de acordo com a maturidade sexual - MA. O eixo x representa o comprimento rostro-cloacal em milímetros de todos os indivíduos amostrados; o eixo y representa o número de indivíduos. Barras escuras representam machos imaturos e barras claras representam machos maduros.



Fonte: SOUZA, E. 2020

3.3 Dimorfismo sexual

3.3.1 População Amazônica

Foi encontrado dimorfismo sexual no Comprimento Rostro-Cloacal (CRC) (Tabela 1.2; Figura 1.13) e no Comprimento da Cauda (CC) (Tabela 1.2; Figura 1.14) entre os indivíduos adultos machos e fêmeas de *Lachesis muta*. Os machos apresentaram tanto maior tamanho corporal do que as fêmeas ($t = -2,6545$, $gL = 91$, $p = 0,009$; Tabela 1.2; Figura 1.12), quanto maior tamanho da cauda (ANCOVA, $F_{2,88} = 42,19$, $p < 0,00001$; Tabela 1.2; Figura 1.13). O índice de dimorfismo sexual (SSD) foi de $-0,062$.

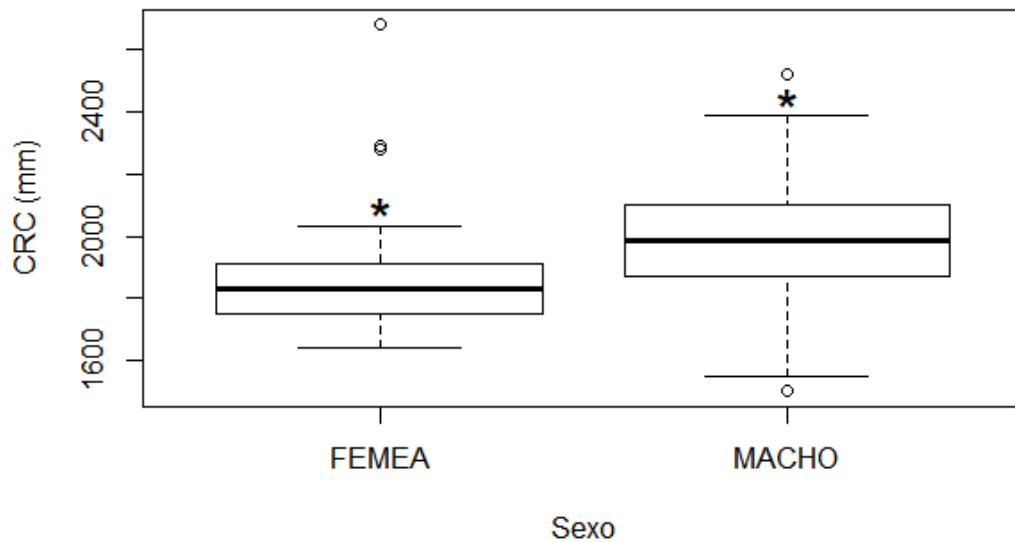
Em relação ao Comprimento da Cabeça (CCAB) (ANCOVA, $F = 0,04$ e $p = 0,83$; Tabela 1.2) e à Largura da Cabeça (LCAB) (ANCOVA, $F = 1,88$ e $p = 0,17$; Tabela 1.2), as fêmeas apresentaram valores médios maiores do que os machos, porém a diferença não foi significativa (Figura 1.15 e 1.16).

Tabela 1.2 – Dados morfológicos dos indivíduos adultos machos e fêmeas da população Amazônica de *L. muta*. DP = desvio padrão.

Variável	Machos			Fêmeas		
	Média ± DP	Mínimo-Máximo	<i>n</i>	Média ± DP	Mínimo-Máximo	<i>n</i>
CRC (mm)	1975,8 ± 237,53	1500-2520	53	1859,5 ± 206,46	1640-2680	40
CC (mm)	185,22 ± 19,22	140-215	54	168,58 ± 14,26	130-195	41
CCAB (mm)	67,7 ± 5,18	55,37-76,9	51	67,78 ± 4,36	56,42-75,41	38
LCAB (mm)	42,94 ± 5,1	33,19-55,67	51	44,28 ± 5,88	31,97-55	37

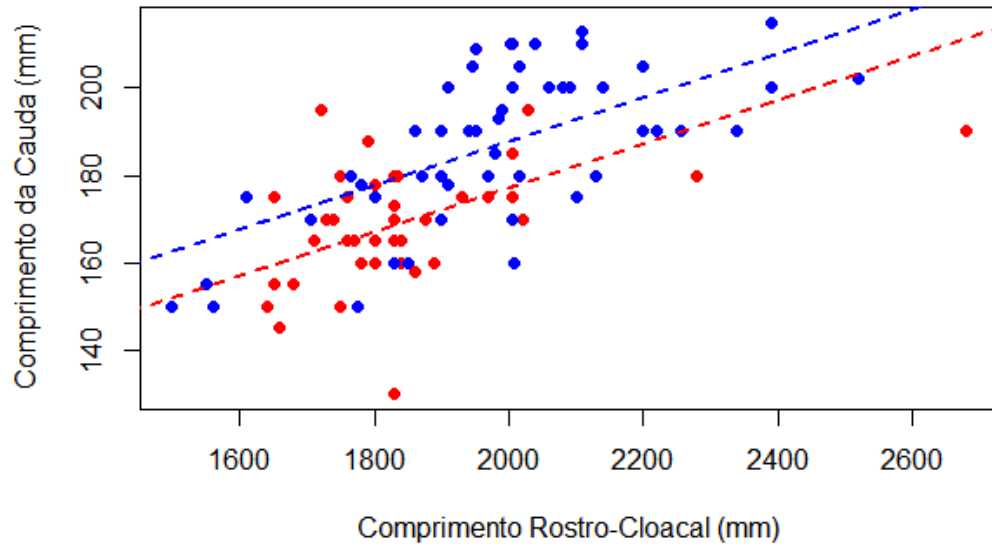
Fonte: SOUZA, E. 2020

Figura 1.13 – Média e variação do comprimento rostro-cloacal (CRC) entre indivíduos adultos machos e fêmeas de *L. muta*. Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os limites máximo e mínimo observados. O asterisco (*) indica diferença significativa.



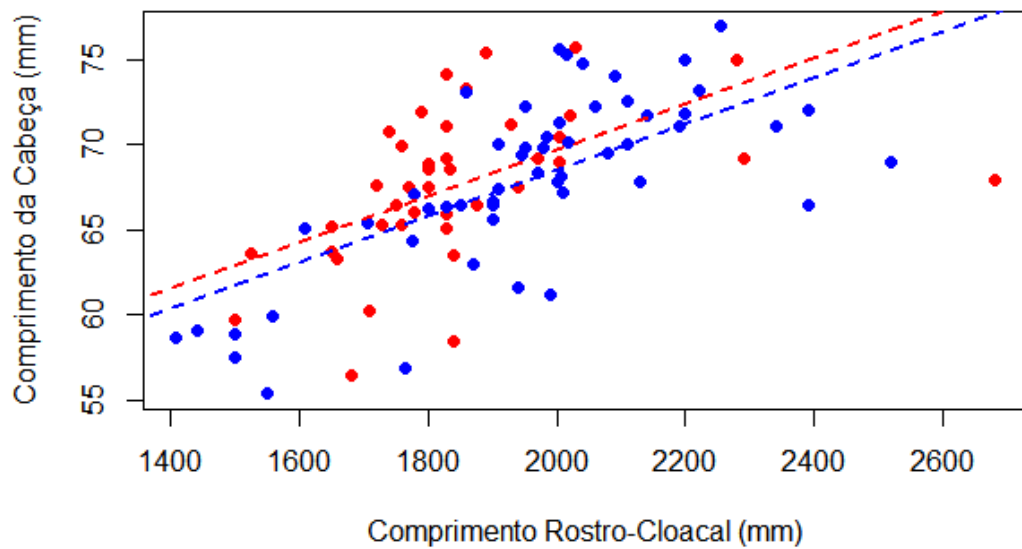
Fonte: SOUZA, E. 2020

Figura 1.14 – Correlação entre comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento da cauda (CC) entre machos e fêmeas de *L. muta*. Pontos vermelhos são os valores observados para as fêmeas e pontos azuis os valores observados para os machos.



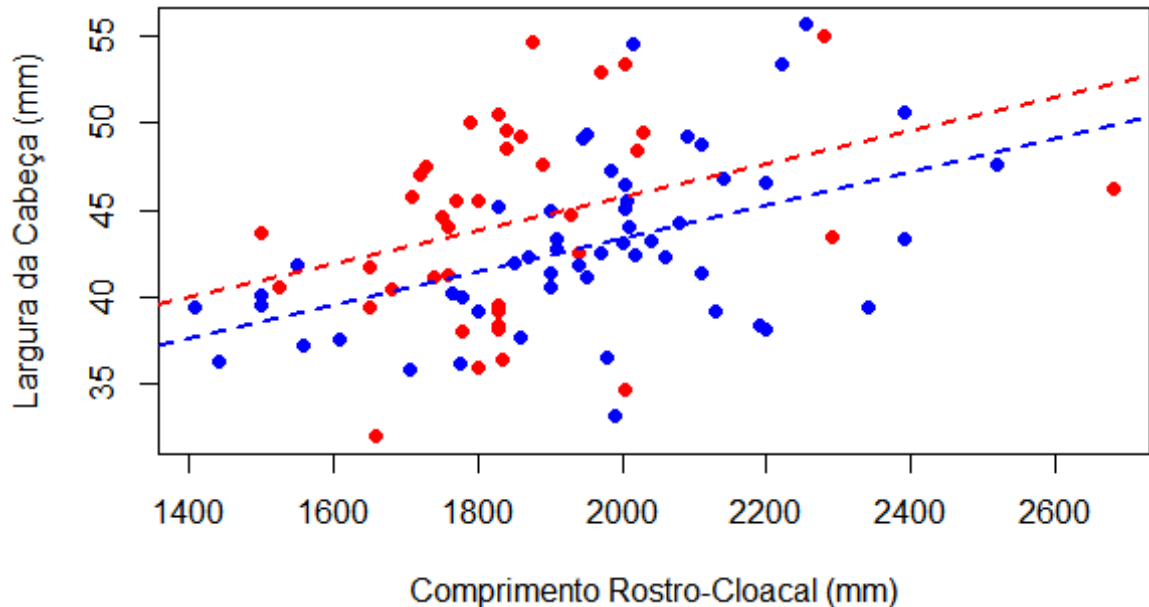
Fonte: SOUZA, E.

Figura 1.15 – Correlação entre comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento da cabeça (CCAB) entre machos e fêmeas de *L. muta*. Pontos vermelhos são os valores observados para as fêmeas e pontos azuis os valores observados para os machos.



Fonte: SOUZA, E.

Figura 1.16 – Correlação entre o comprimento rostro-cloacal (CRC) e a largura da cabeça (LCAB) entre machos e fêmeas de *L. muta*. Pontos vermelhos representam valores observados para fêmeas e pontos azuis valores observados para machos.



Fonte: SOUZA, E. 2020

3.3.2 População da Mata Atlântica

Foi encontrado dimorfismo sexual no Comprimento Rostro-Cloacal (CRC) (Tabela 1.3; Figura 1.17) e no Comprimento da Cauda (CC) (Tabela 1.3; Figura 1.18) entre os indivíduos adultos machos e fêmeas de *Lachesis muta*. Os machos apresentaram tanto maior tamanho corporal do que as fêmeas ($t = -2.8953$, $gL = 88$, $p = 0,004777$; Tabela 1.3; Figura 1.16), quanto maior tamanho da cauda (ANCOVA, $F_{2,86} = 12,53$, $p < 0,0001$; Tabela 1.3; Figura 1.17). O índice de dimorfismo sexual (SSD) foi de $-0,09$.

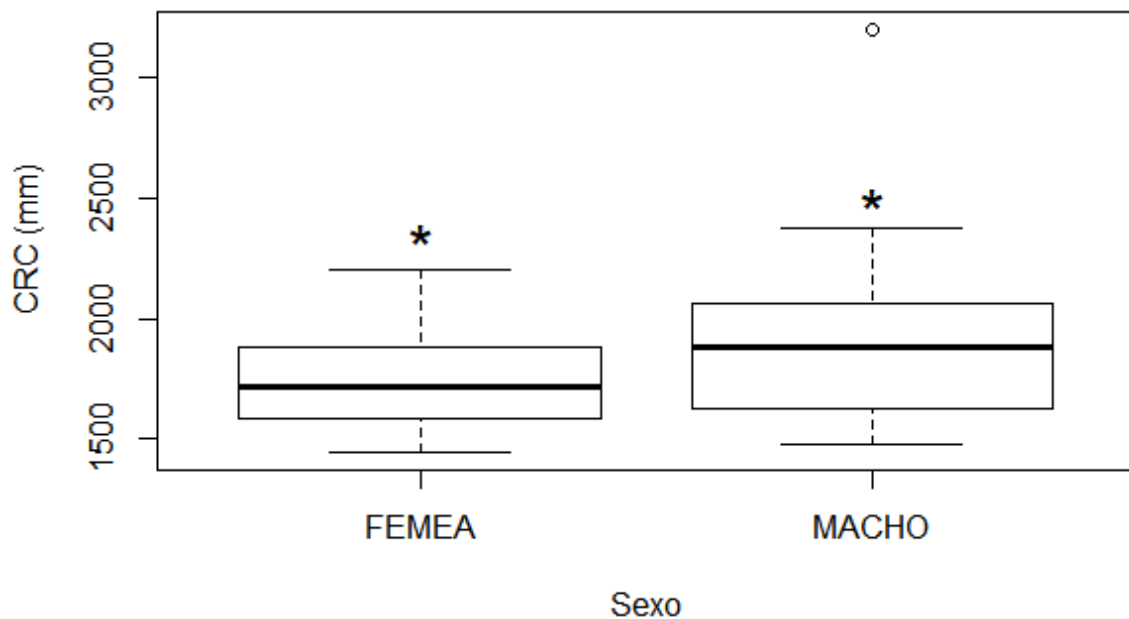
Em relação ao Comprimento da Cabeça (CCAB) (Pearson; $p = 0,06576$; $t = -0,5304$, $gL = 43$, $p = 0,5986$; Tabela 1.3) e à Largura da Cabeça (LCAB) (Pearson; $p = 0,631$; $t = -1.8678$, $gL = 28$, $p = 0,07229$; Tabela 1.3), e os machos apresentaram valores médios maiores do que as fêmeas, porém não houve diferença significativa (Figura 1.19 e 1.20).

Tabela 1.3 – Dados morfológicos dos indivíduos adultos machos e fêmeas da população da Mata Atlântica de *L. muta*. DP = desvio padrão.

Variável	Machos			Fêmeas		
	Média ± DP	Mínimo-Máximo	<i>n</i>	Média ± DP	Mínimo-Máximo	<i>n</i>
CRC (mm)	1894,8 ± 319,40	1510-3200	43	1737,98 ± 181,19	1444-2200	47
CC (mm)	157,84 ± 19,64	60-184	43	143,40 ± 12,9	101-166	47
CCAB (mm)	70,45 ± 11,13	30-85	24	69,05 ± 5,28	60-78	21
LCAB (mm)	40,94 ± 5,41	32,36-52	13	37,76 ± 3,93	30-44,82	17

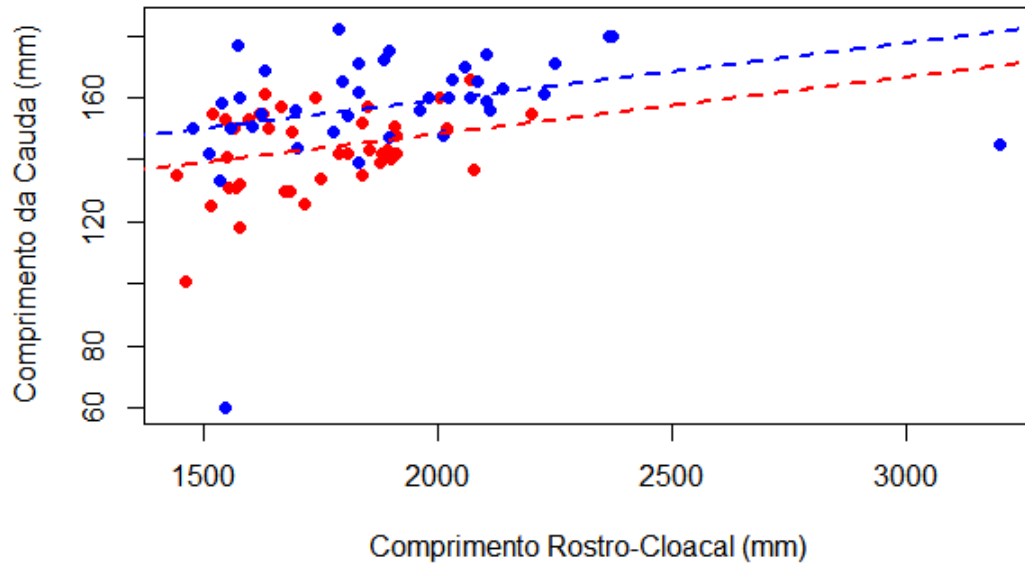
Fonte: ALVES et al., 2014

Figura 1.17 – Média e variação do comprimento rostro-cloacal (CRC) entre indivíduos adultos machos e fêmeas de *L. muta* da Mata Atlântica. Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os limites máximo e mínimo observados. O asterisco (*) indica diferença significativa.



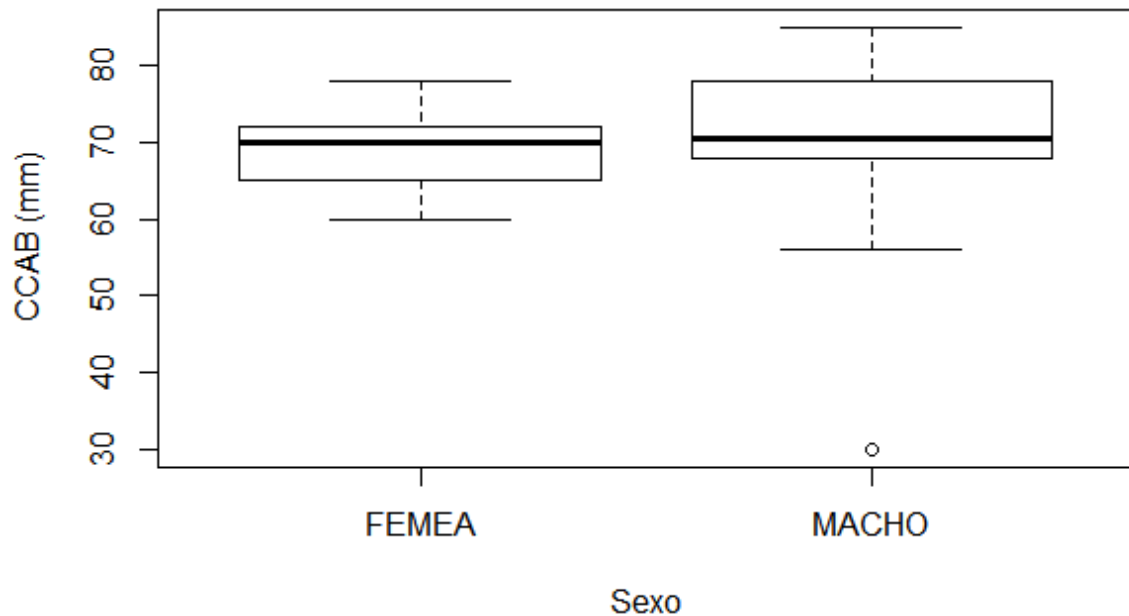
Fonte: SOUZA, E. 2020

Figura 1.18 – Correlação entre comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento da cauda (CC) entre machos e fêmeas de *L. muta* da Mata Atlântica. Pontos vermelhos são os valores observados para as fêmeas e pontos azuis os valores observados para os machos.



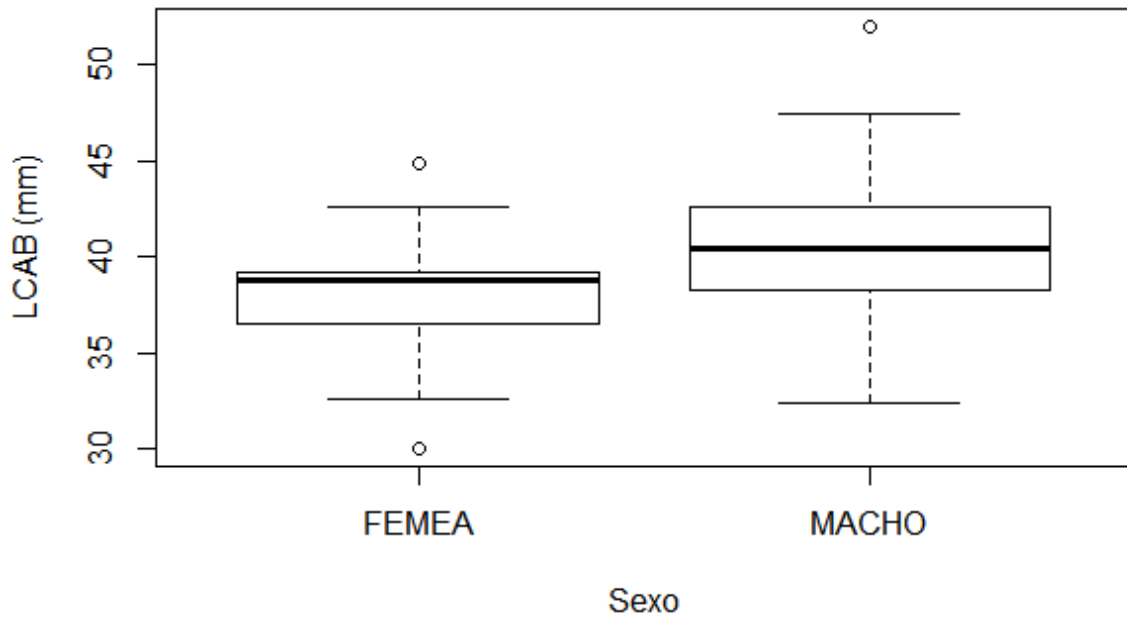
Fonte: SOUZA, E. 2020

Figura 1.19 – Média e variação do comprimento da cabeça (CCAB) entre indivíduos adultos machos e fêmeas de *L. muta* da Mata Atlântica. Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os limites máximo e mínimo observados.



Fonte: SOUZA, E. 2020

Figura 1.20 – Média e variação da largura da cabeça (LCAB) entre indivíduos adultos machos e fêmeas de *L. muta* da Mata Atlântica. Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os limites máximo e mínimo observados.



Fonte: SOUZA, E. 2020

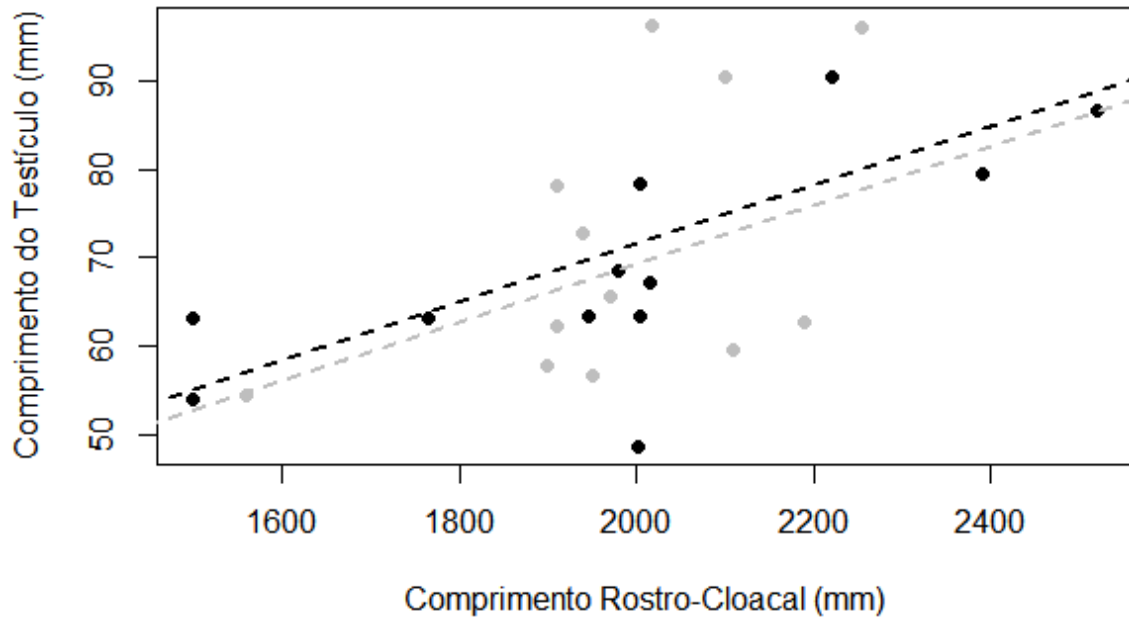
3.4 Ciclo reprodutivo dos machos

3.4.1 População da Floresta Amazônica

3.4.1.1 Variação do comprimento e volume testicular

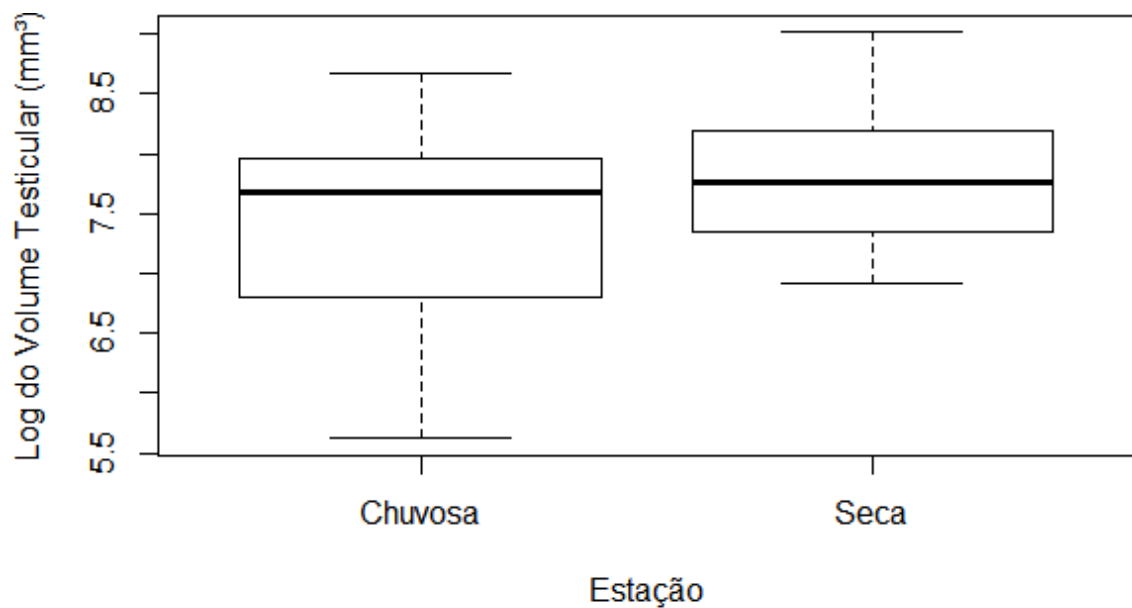
Um total de 23 machos foram utilizados para obtenção de medidas do testículo, sendo 10 da estação seca e 13 da chuvosa. Para o volume testicular, o valor médio para a estação seca foi 7,76 mm³ e 7,35 mm³ para a estação chuvosa. Já no caso do comprimento testicular, o valor médio para a estação chuvosa foi maior. Entretanto, não foi encontrada nenhuma variação significativa tanto no comprimento (ANCOVA; $F = 5,552$, $p = 0,68$; Figura 1.21) quanto no volume testicular ($t = -1,1555$, $gL = 20$, $p = 0,26$; Figura 1.22) entre as estações seca e chuvosa.

Figura 1.21 – Correlação entre comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento do testículo de machos de *L. muta*. Pontos pretos são os valores observados para a estação chuvosa e pontos cinzas os valores observados para a estação seca.



Fonte: SOUZA, E. 2020

Figura 1.22 – Média e variação do Log do Volume Testicular entre indivíduos adultos machos de *L. muta* ao longo das estações seca e chuvosa. Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os limites máximo e mínimo observados.

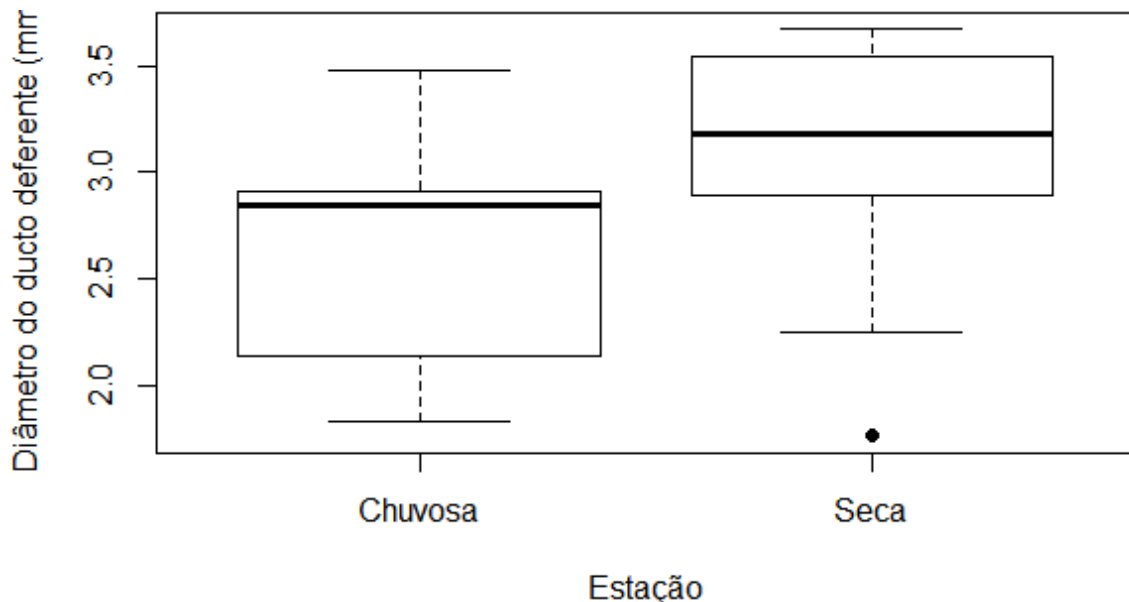


Fonte: SOUZA, E. 2020

3.4.1.2 Variação do diâmetro do ducto deferente

Um total de 18 machos foram utilizados para obtenção das medidas do ducto deferente., O valor médio para a estação seca foi de 3,03 mm e 2,65 mm para a estação chuvosa. Entretanto, não foi encontrada nenhuma variação significativa no diâmetro do ducto deferente ao longo das estações seca (n = 9) e chuvosa (n = 9) ($t = -1,3562$, $g_L = 16$, $p = 0,19$; Figura 1.23)

Figura 1.23 – Média e variação do Diâmetro do Ducto Deferente entre indivíduos adultos machos de *L. muta* ao longo das estações seca e chuvosa. Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão.



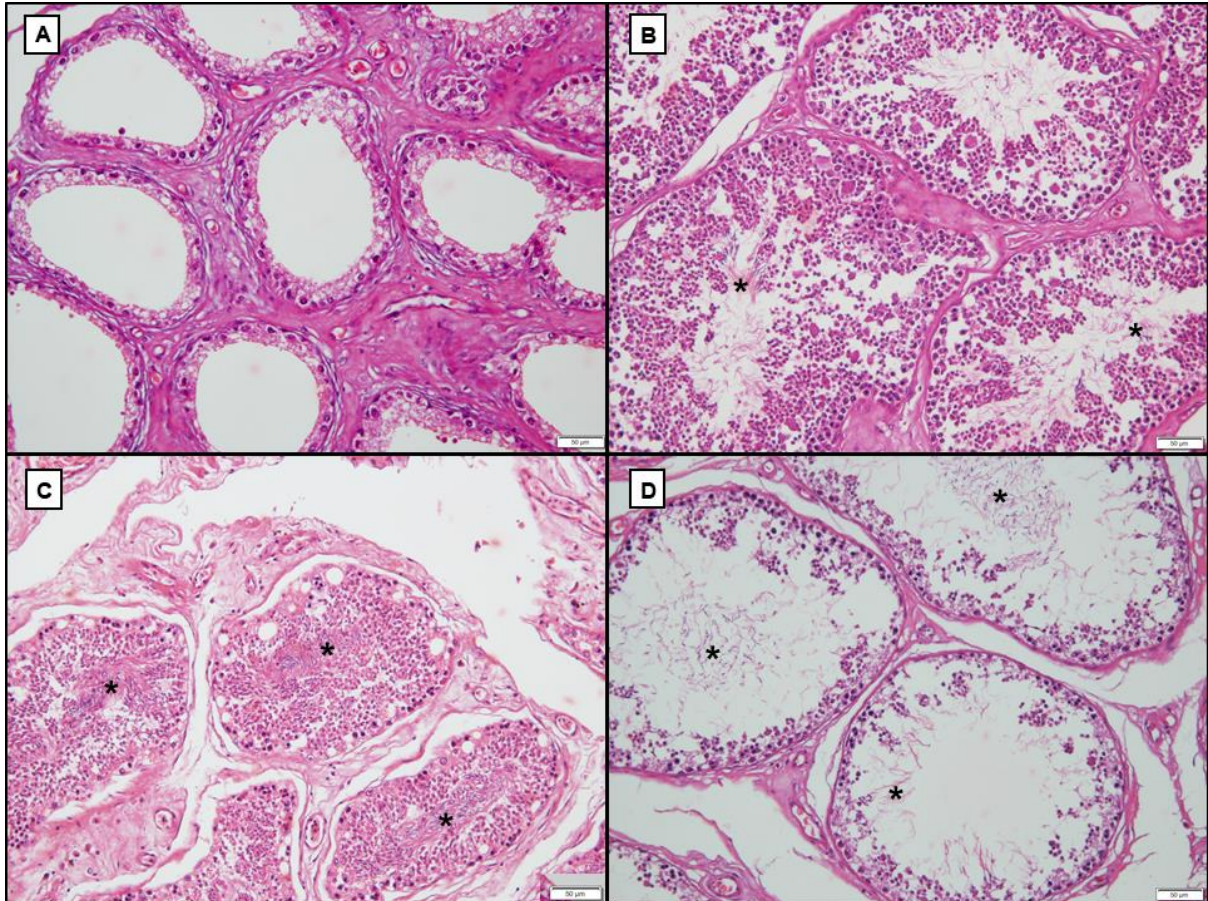
Fonte: SOUZA, E. 2020

3.4.1.3 Ciclo espermato gênico

Foram examinados um total de 22 machos maduros, sendo 10 da estação chuvosa (novembro a abril) e 12 da estação seca (maio a outubro). A regressão testicular (estágio 1; Figura 1.24 A) foi encontrada em quatro indivíduos coletados apenas durante a estação seca, nos meses de setembro (n = 2) e outubro (n = 2). O início da espermiogênese (estágio 2) foi observada em dois indivíduos, um no início da estação chuvosa, no mês de novembro, e um no início da estação seca, no mês de maio. A espermiogênese (estágio 3; Figura 1.24 B) foi observada em 9 animais, tanto na estação seca (maio, n = 3; julho, n = 1) quanto na estação chuvosa (novembro, n = 1; dezembro, n = 1; abril, n = 3). A espermição, fase do pico de produção de espermatozoides (estágio 4; Figura 1.24 C) foi encontrada em quatro machos,

sendo um coletado no início da estação seca (maio) e o restante na estação chuvosa (novembro, março e abril). O final da espermiacção (estágio 5; Figura 1.24 D) foi observada em dois animais coletados na estação seca (julho e agosto).

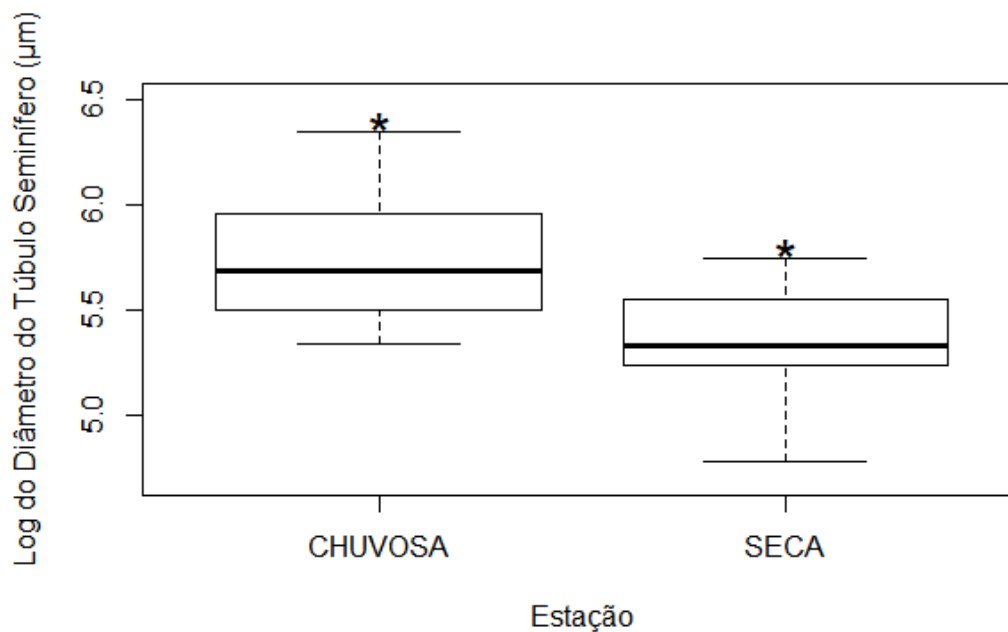
Figura 1.24 – Ciclo espermatogênico de *L. muta*. A) Regressão testicular – estágio 1 (outubro; 20x); B) Espermiogênese – estágio 3 (abril; 20x); C) Espermiacção – estágio 4 (março; 20x); D) Final da espermiacção – estágio 5 (julho; 20x). O asterisco (*) indica a presença de espermatozoides.



Fonte: SOUZA, E. 2020.

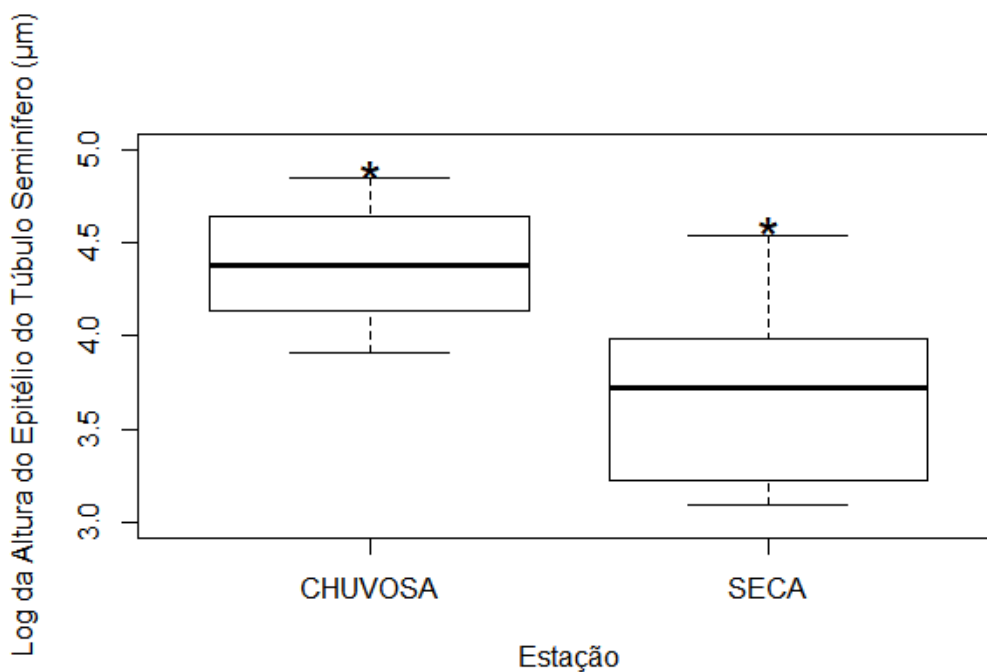
Para a primeira análise que considerou a estação seca e chuvosa, as medidas do diâmetro do túbulo seminífero tiveram variação significativa entre as estações ($t = 2.6728$, $gL = 17$, $p = 0,01606$; Figura 1.25). A média observada para a estação chuvosa foi de $330,192 \mu\text{m}$, enquanto a média observada para a estação seca foi de $219,240 \mu\text{m}$. A mesma diferença foi observada para a variação das medidas da altura do epitélio dos túbulos seminíferos ($t = 3.7681$, $gL = 17$, $p = 0,001533$; Figura 1.26). A média observada para a estação chuvosa foi de $85,764 \mu\text{m}$, enquanto a média observada para a estação seca foi de $43,744 \mu\text{m}$.

Figura 1.25 – Média e variação do comprimento do Log do Diâmetro do Túbulo Seminífero para duas estações. Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os limites máximo e mínimo observados. O asterisco (*) indica diferença significativa.



Fonte: SOUZA, E. 2020

Figura 1.26 – Média e variação do comprimento da altura do Log do Epitélio do Túbulo Seminífero para duas estações. Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os limites máximo e mínimo observados. O asterisco (*) indica diferença significativa.



Fonte: SOUZA, E. 2020

Para o segundo método de análise, que considerou as duas estações divididas em quatro períodos (início e fim da estação chuvosa e início e fim da estação seca), as variáveis continuaram apresentando diferenças significativas. Para o diâmetro do túbulo seminífero (ANOVA, $F = 7,859$, $p = 0,0022$; Figura 1.27), o teste a posteriori de Tukey revelou que a diferença está entre a amostra do final da estação chuvosa (FEC: fevereiro, março e abril) e do final da estação seca (FES: agosto, setembro e outubro) (Tukey FEC-FES, $p = 0,00109$). Para a altura do epitélio (ANOVA, $F = 13,49$, $p = 0,000156$; Figura 1.28), o teste a posteriori de Tukey apresentou três períodos de diferença significativa entre as medidas microscópicas: início da estação chuvosa (IEC: novembro, dezembro e janeiro) e início da estação seca (IES: maio, junho e julho) (Tukey IEC-IES, $p = 0,0173$), início da estação chuvosa (IEC) e final da estação seca (FES) (Tukey IEC-FES, $p = 0,00331$), e final da estação chuvosa (FEC) e final da estação seca (FES) (Tukey FEC-FES, $p = 0,0000954$).

Figura 1.27 – Média e variação do comprimento do Log do Diâmetro do Túbulo Seminífero (eixo y) para quatro estações (eixo x). Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os limites máximo e mínimo observados. O asterisco (*) indica diferença significativa. FEC = final da estação chuvosa; IES = início da estação seca; FES = final da estação seca; IEC = início da estação chuvosa.

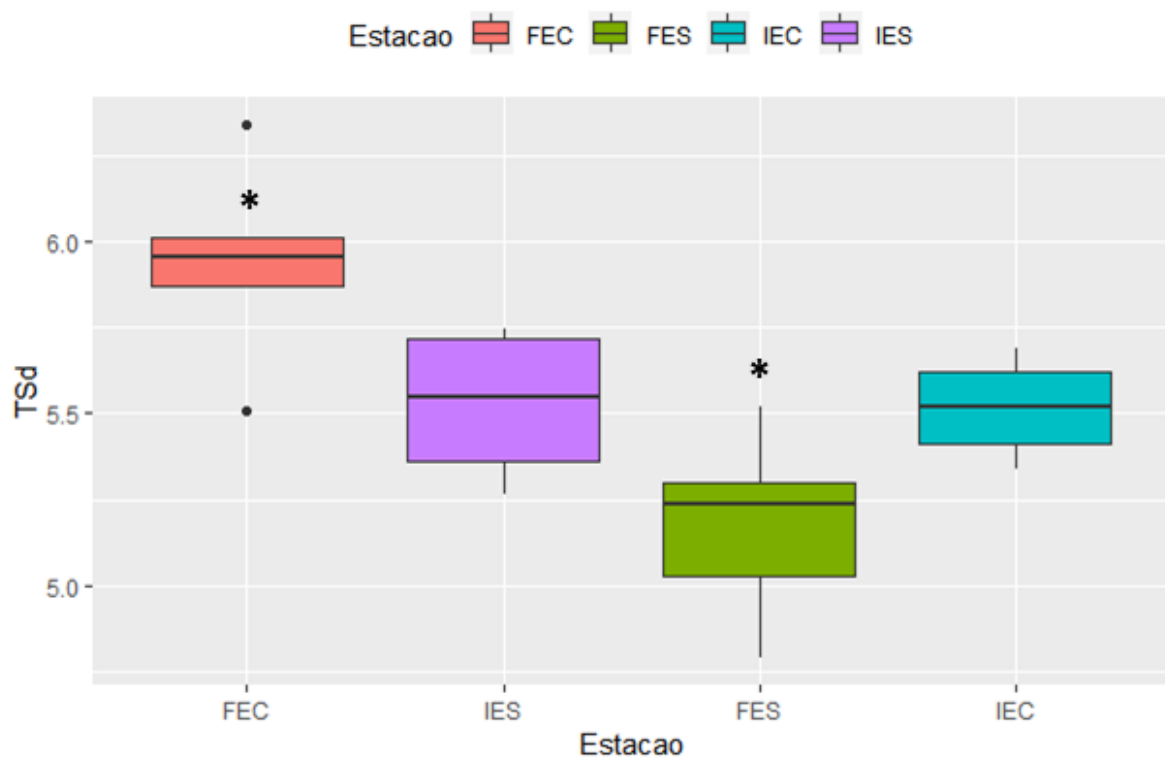
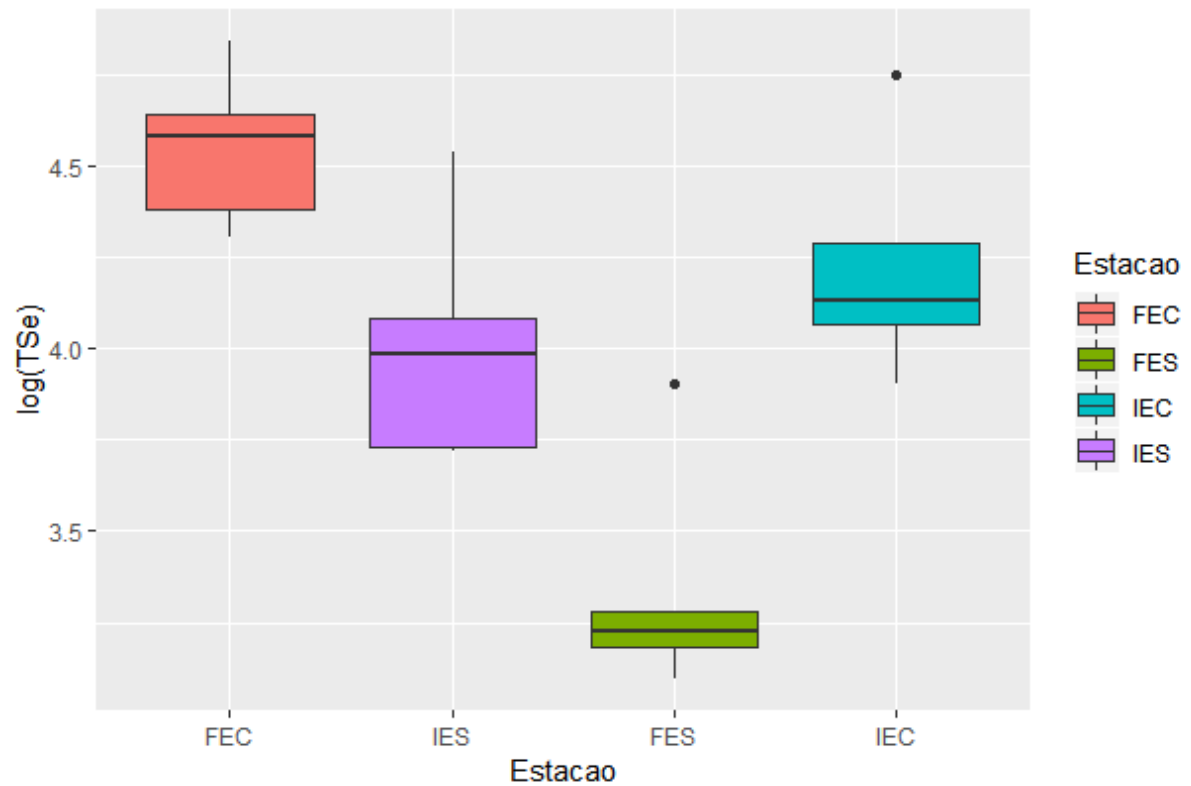


Figura 1.28 – Média e variação do comprimento do Log do Epitélio do Túbulo Seminífero (eixo y) para quatro estações (eixo x). Limites representam intervalos de 95% de confiança. FEC = final da estação chuvosa; IES = início da estação seca; FES = final da estação seca; IEC = início da estação chuvosa.

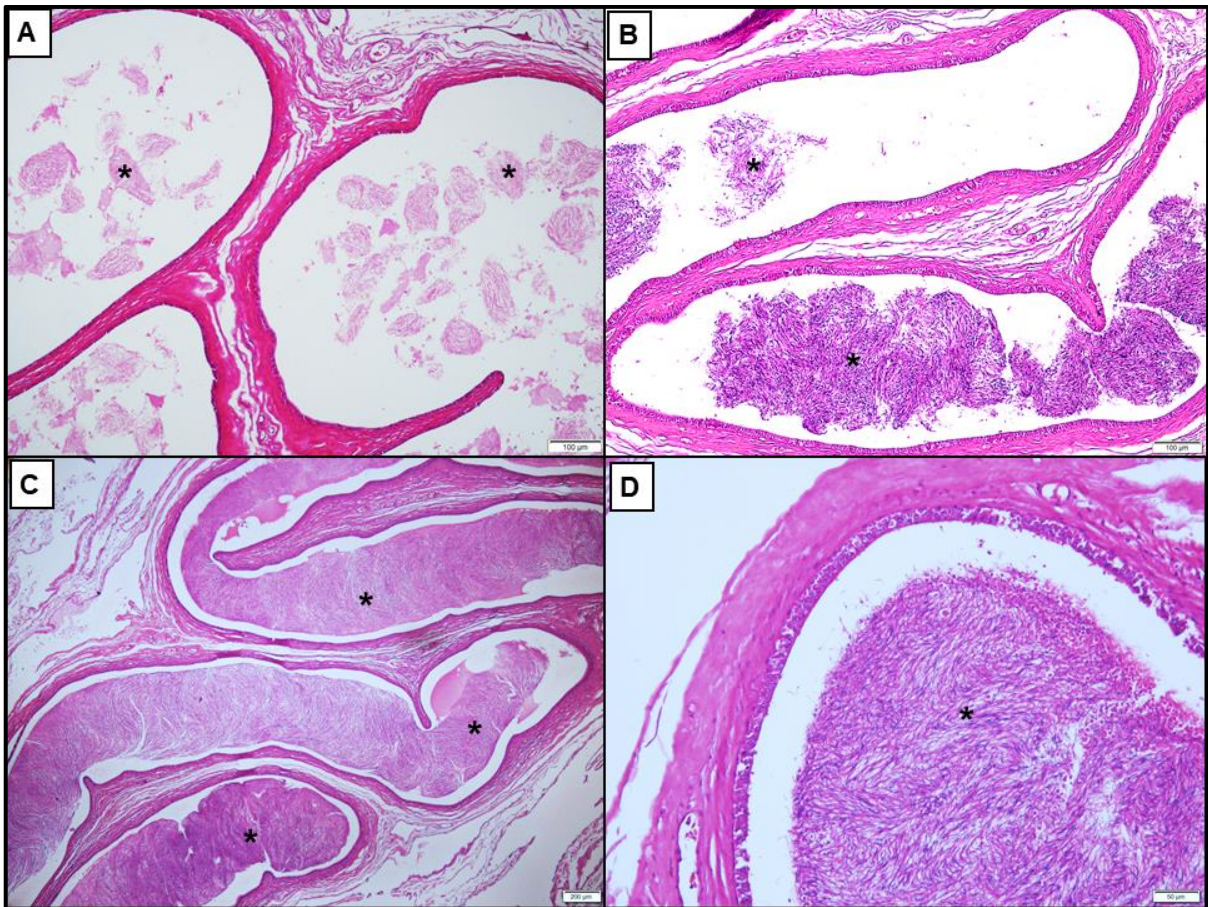


Fonte: SOUZA, E. 2020

3.4.1.4 Estocagem no ducto deferente

Em relação à estocagem de espermatozoides no ducto deferente, foram examinados 19 indivíduos machos adultos. O ducto esvaziado foi observado em um indivíduo (Figura 1.29 A), coletado no mês de setembro e que também apresentava túbulo seminífero quiescente. Entre o final da estação chuvosa e início da estação seca, nos meses de abril, maio e julho, foi observada uma quantidade reduzida de espermatozoides estocados no ducto deferente de alguns indivíduos ($n = 4$; Figura 1.29 B). O restante dos animais analisados apresentou ducto deferente completamente cheio independente do mês ou da estação em que foram coletados ($n = 14$; novembro, dezembro, março, abril, maio, julho e agosto; Figura 1.29 C e D).

Figura 1.29 – Estocagem de espermatozoides no ducto deferente. A) Ducto deferente esvaziado (setembro; 10x); B) Ducto deferente com poucos espermatozoides (maio; 4x); C) Ducto deferente cheio (agosto; 4x); D) Ducto deferente cheio em maior aumento (agosto; 20x). O asterisco (*) indica a presença de espermatozoides.



Fonte: SOUZA, E. 2020.

3.4.1.5 Segmento Sexual Renal (SSR)

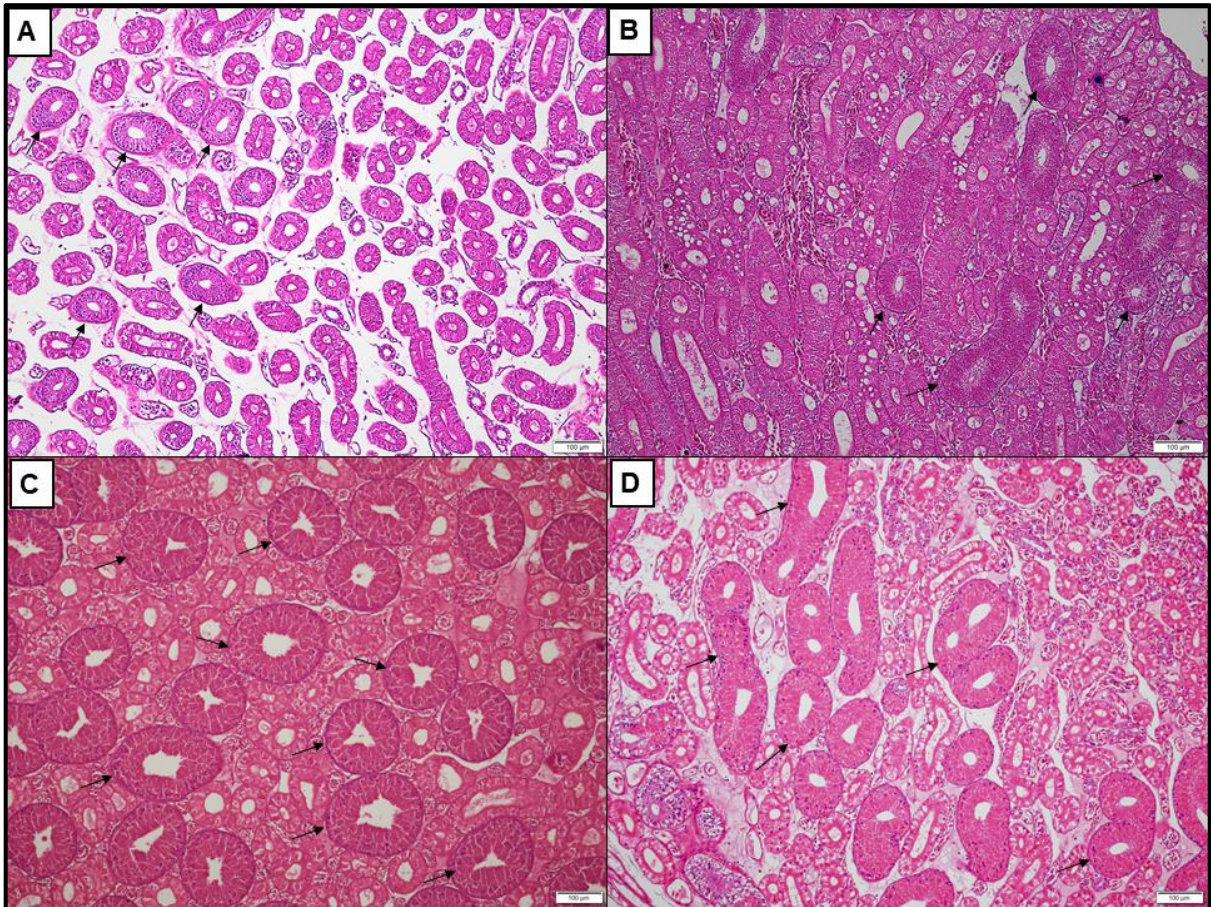
Para avaliação da hipertrofia do segmento sexual renal (SSR) foram examinados 21 machos adultos, sendo 10 indivíduos coletados na estação chuvosa e 11 indivíduos coletados na estação seca.

Em análise visual preliminar comparativa do diâmetro do segmento sexual renal, a maioria dos machos apresentavam os túbulos do SSR altamente ou moderadamente hipertrofiado ao longo do ano, sugerindo um padrão sazonal para essa estrutura. Além disso, também verificamos assincronia entre os indivíduos da população. Apenas 4 machos aparentavam hipotrofia do SSR, coletados tanto na estação seca quanto na chuvosa (outubro, n = 2; novembro, n = 1; abril, n = 1; Figura 1.30 A). Oito indivíduos aparentavam SSR moderadamente hipertrofiado, coletados em ambas as estações (novembro, n = 1; dezembro, n = 1; abril, n = 2; maio, n = 1; julho, n = 1; agosto, n = 1; setembro, n = 1; Figura 1.30 B), e 8

indivíduos observados apresentaram o SSR altamente hipertrofiado, também coletados em ambas as estações (novembro, n = 2; março, n = 1; maio, n = 3; julho, n = 1; setembro, n = 1; Figura 1.30 C e D).

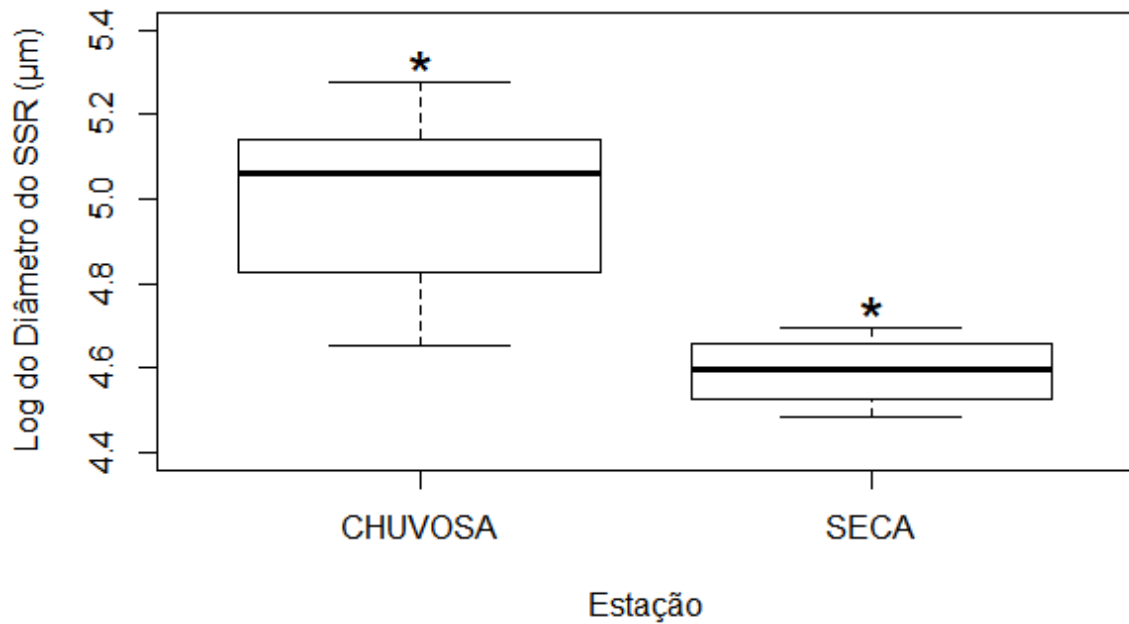
Para as medidas microscópicas, o teste de Mann Whitney Wilcoxon foi utilizado. O diâmetro dos túbulos do SSR apresentou diferença significativa entre as estações seca e chuvosa. O valor médio para a estação chuvosa foi de 151 μm , significativamente maior ($W = 78$, $p = 0,00028$; Figura 1.31) do que o valor médio de 99,46 μm para a estação seca. O mesmo foi observado para a altura do epitélio do SSR, em que o valor médio para a estação chuvosa foi de 57,78 μm , significativamente maior ($W = 66$, $p = 0,001234$; Figura 1.32) do que o valor médio de 41,50 μm para a estação seca.

Figura 1.30 – Ciclo do Segmento Sexual Renal. Corte longitudinal. Hematoxilina-eosina. A) SSR hipotrofiado no final da estação chuvosa (abril; 10x); B) SSR moderadamente hipertrofiado na estação seca (setembro; 10x); C) e D) SSR hipertrofiado no início da estação chuvosa (novembro; 10x). As setas indicam os túbulos do SSR.



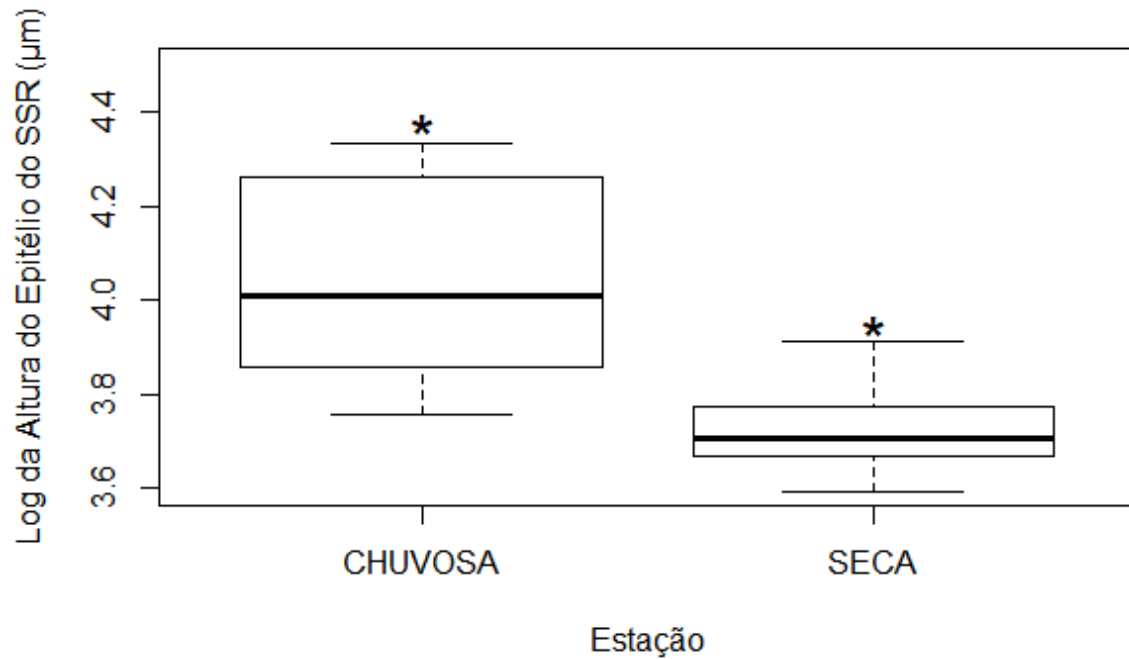
Fonte: SOUZA, E. 2020

Figura 1.31 – Média e variação do comprimento do Log do Diâmetro do Segmento Sexual Renal (SSR) para duas estações. Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os limites máximo e mínimo observados. O asterisco (*) indica diferença significativa.



Fonte: SOUZA, E. 2020

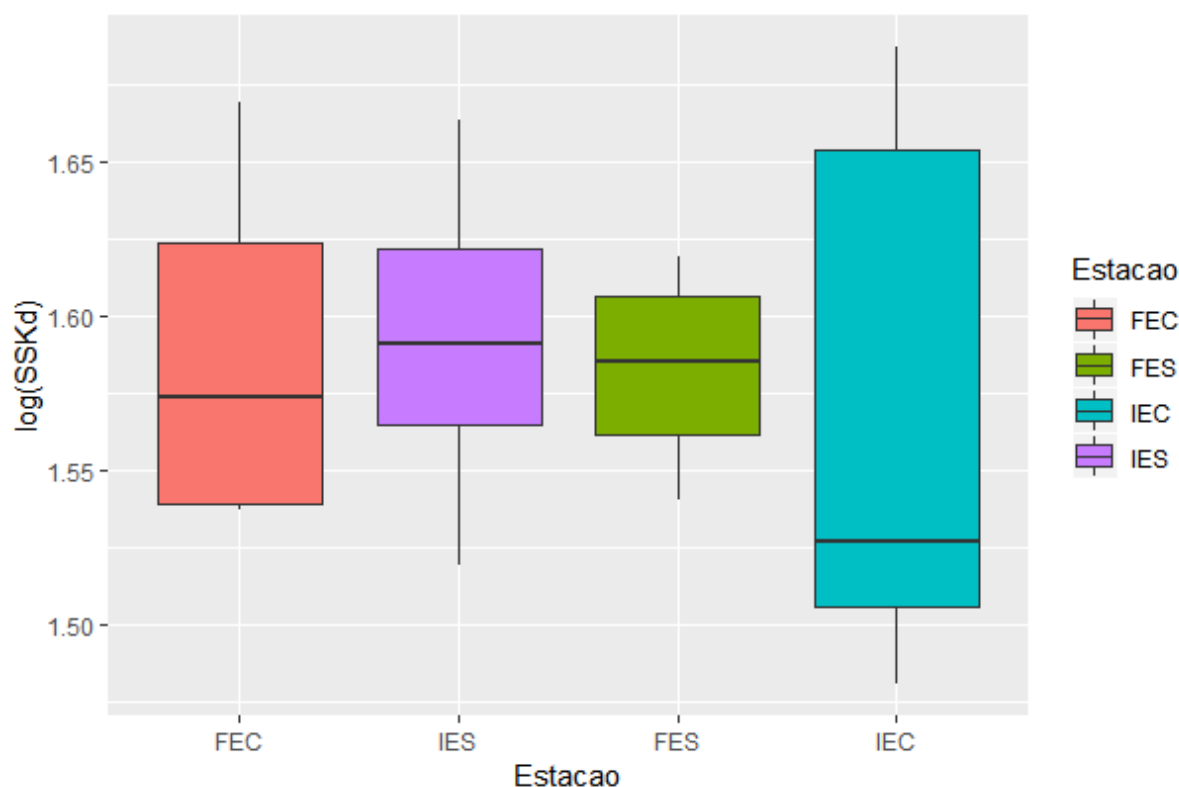
Figura 1.32 – Média e variação do comprimento do Log da Altura do Epitélio do Segmento Sexual Renal (SSR) para duas estações. Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os limites máximo e mínimo observados. O asterisco (*) indica diferença significativa.



Fonte: SOUZA, E. 2020

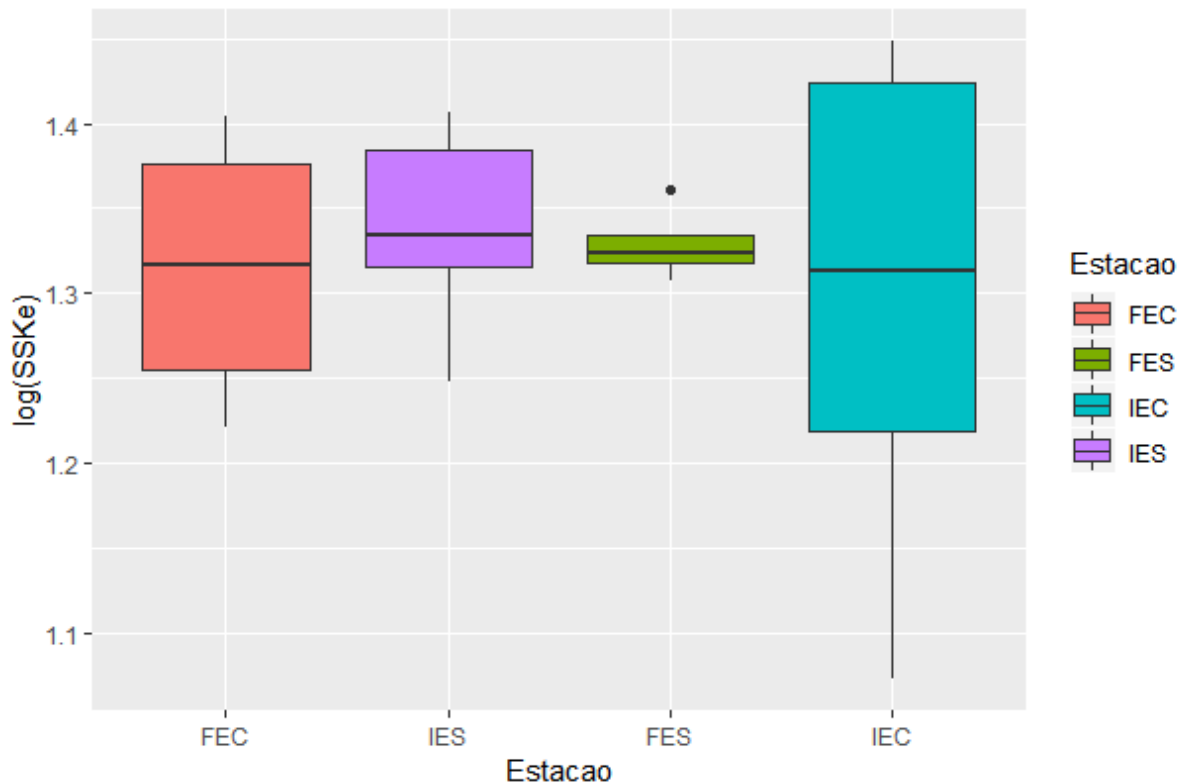
Já no segundo método de análise, as variáveis não apresentaram diferenças significativas. Para o diâmetro do SSR, o teste de Krustal Wallis não apontou nenhuma diferença significativa entre as estações avaliadas (Krustal Wallis, $X^2 = 0,51754$, $gL = 3$, $p = 0,915$; Figura 1.33). Para a altura do epitélio do SSR, também não foi encontrada diferença significativa (ANOVA, $F = 0,136$, $p = 0,937$; Figura 1.34).

Figura 1.33 – Média e variação do comprimento do Log do Diâmetro do Segmento Sexual Renal (eixo y) para quatro estações (eixo x). Limites representam intervalos de 95% de confiança. FEC = final da estação chuvosa; IES = início da estação seca; FES = final da estação seca; IEC = início da estação chuvosa.



Fonte: SOUZA, E. 2020

Figura 1.34 – Média e variação do comprimento do Log da Altura do Epitélio do Segmento Sexual Renal (eixo y) para quatro estações (eixo x). Limites representam intervalos de 95% de confiança. FEC = final da estação chuvosa; IES = início da estação seca; FES = final da estação seca; IEC = início da estação chuvosa.



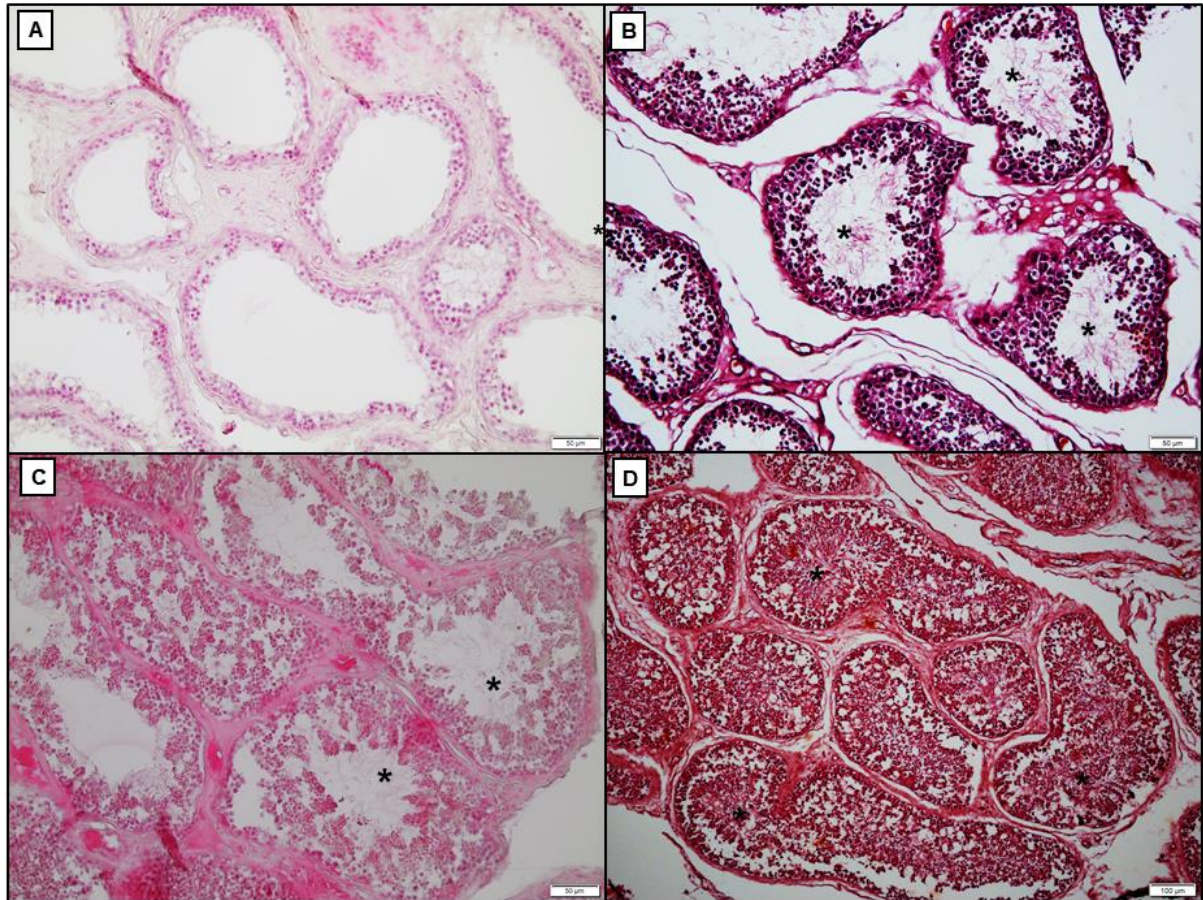
Fonte: SOUZA, E. 2020

3.4.2 População da Mata Atlântica

3.4.2.1 Ciclo espermatogênico

Foram examinados um total de 13 machos maduros, sendo 8 das estações outono e inverno (20 de março até 21 de setembro) e 5 das estações primavera e verão (22 de setembro até 19 de março). A regressão testicular (estágio 1; Figura 1.35 A) foi encontrada em três indivíduos coletados nos meses de novembro, dezembro e fevereiro (primavera/verão). O início da espermiogênese (estágio 2) foi observada em quatro indivíduos nos meses de março, abril, maio e julho (outono/inverno). A espermiogênese (estágio 3; Figura 1.35 B e C) foi observada em quatro animais, nos meses de junho, julho e agosto (outono/inverno). A espermição, fase do pico de produção de espermatozoides (estágio 4; Figura 1.35 D) foi encontrada em um macho coletado em janeiro (verão). Um macho coletado em agosto (inverno) estava no início da regressão testicular (estágio 5).

Figura 1.35 – Ciclo espermatogênico de *L. muta*. A) Regressão testicular – estágio 1 (dezembro; 20x); B) Espermiogênese – estágio 3 (julho; 20x); C) Espermiogênese – estágio 3 (agosto; 20x); D) Espermiacão – estágio 4 (janeiro; 10x). O asterisco (*) indica a presença de espermatozoides.

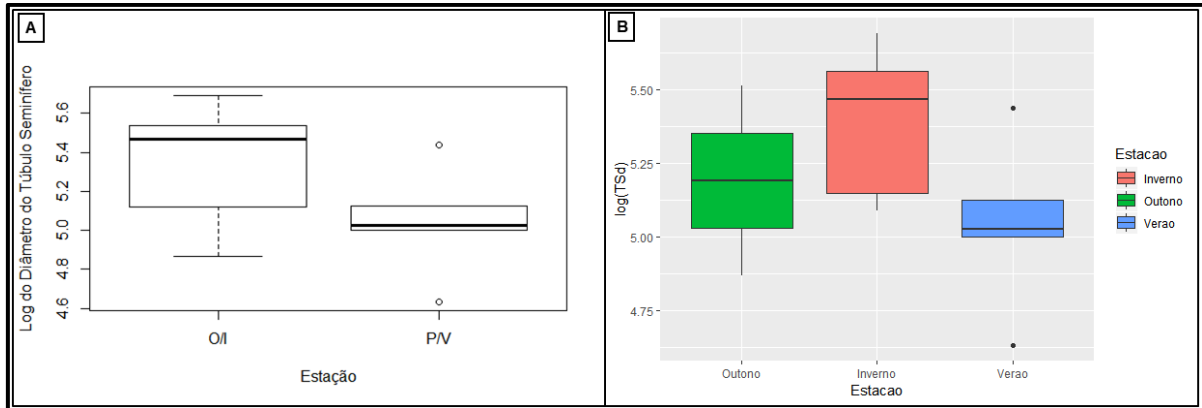


Fonte: SOUZA, E. 2020.

Para a primeira análise, as medidas do diâmetro do túbulo seminífero não tiveram variação significativa entre as estações Outono/Inverno (O/I) e Primavera/Verão (P/V) ($t = 1.6701$, $gL = 10$, $p = 0,1259$; Figura 1.36 A). A média observada para a estação O/I foi de $215,166 \mu\text{m}$, maior do que a média de $160,446 \mu\text{m}$ observada para a estação P/V. Também não encontramos diferença significativa para a variação das medidas da altura do epitélio dos túbulos seminíferos ($t = 1.6731$, $gL = 10$, $p = 0,1253$; Figura 1.37 A). A média observada para a estação O/I foi de $63,236 \mu\text{m}$, maior do que a média de $37,495 \mu\text{m}$ observada para a estação P/V.

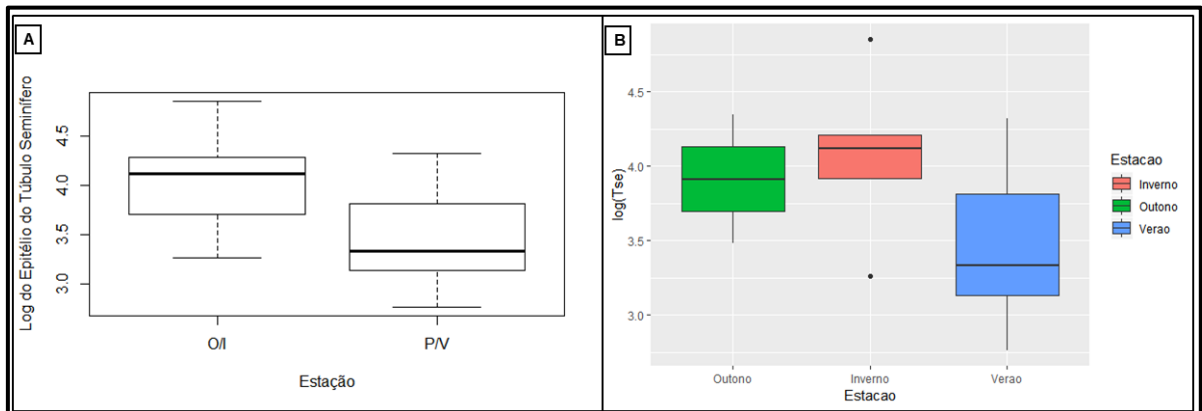
Considerando as estações separadamente, também não foi verificada nenhuma diferença significativa tanto para as medidas do diâmetro do túbulo seminífero (ANOVA; $F = 1,664$, $p = 0,243$; Figura 1.36 B) quanto para as medidas da altura do epitélio do túbulo seminífero (ANOVA; $F = 1.325$, $p = 0.313$; Figura 1.37 B).

Figura 1.36 – Média e variação do Log do Diâmetro do Túbulo Seminífero. A) Duas estações. O/I = outono/inverno; P/V = primavera/verão. B) Três estações. Verde = outono; Vermelho = Inverno; Azul = Verão. Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os limites máximo e mínimo observados.



Fonte: SOUZA, E. 2020.

Figura 1.37 – Média e variação do Log da altura do Epitélio do Túbulo Seminífero. A) Duas estações. O/I = outono/inverno; P/V = primavera/verão. B) Três estações. Verde = outono; Vermelho = Inverno; Azul = Verão. Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os limites máximo e mínimo observados.



Fonte: SOUZA, E. 2020.

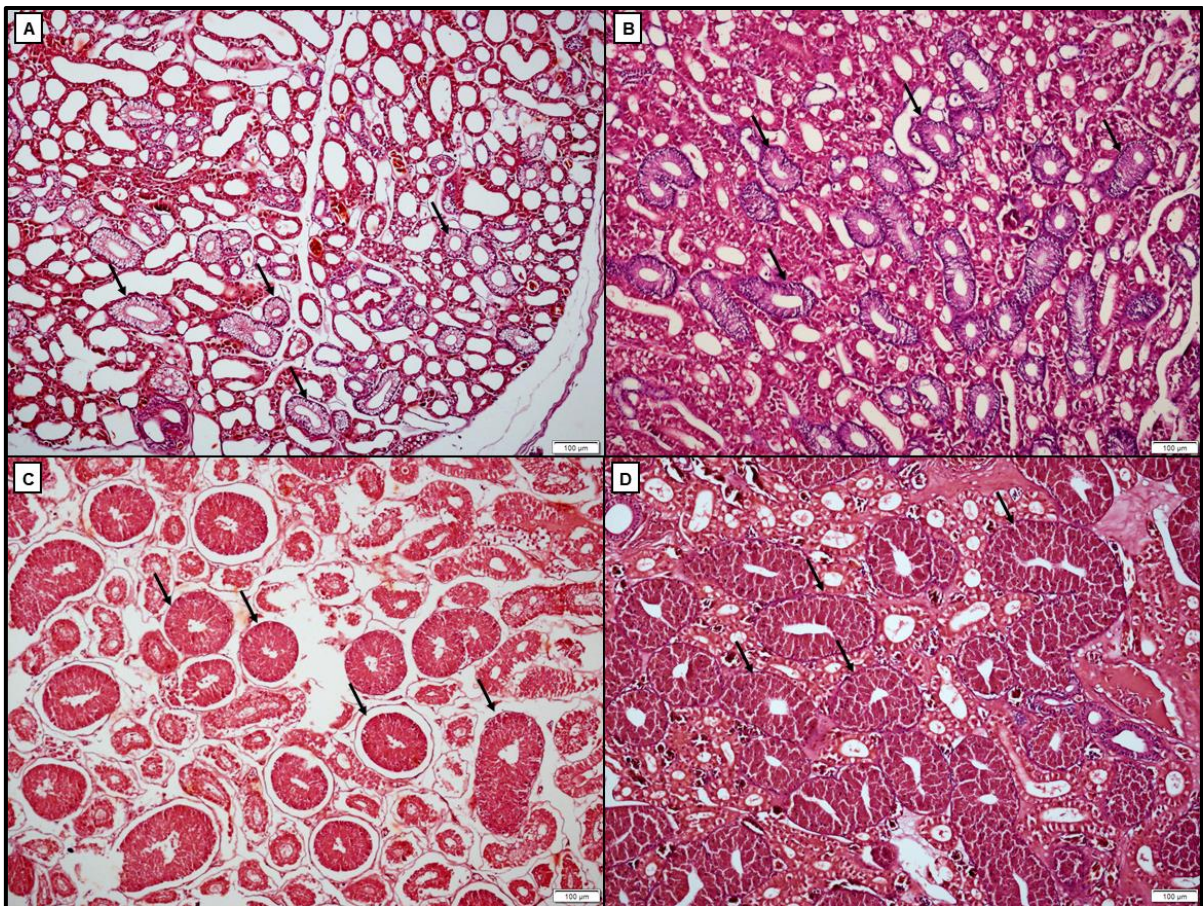
3.4.2.2 Estocagem no Ducto Deferente

Foram examinados um total de 9 machos maduros, sendo 7 das estações outono e inverno (20 de março até 21 de setembro) e 2 das estações primavera e verão (22 de setembro até 19 de março). Dois machos, um coletado em abril e outro em maio (outono) apresentava poucos espermatozoides no ducto. O restante dos animais ($n = 7$) apresentou ductos cheios de espermatozoides em todos os meses avaliados (janeiro, fevereiro, maio, junho, julho e agosto).

3.4.2.3 Ciclo do Segmento Sexual Renal (SSR)

Foram examinados um total de 12 machos maduros, sendo 8 das estações outono e inverno (20 de março até 21 de setembro) e 4 das estações primavera e verão (22 de setembro até 19 de março). A hipotrofia do SSR (Figura 1.38 A) foi encontrada em dois indivíduos coletados nos meses de fevereiro e março (verão). O SSR moderadamente hipertrofiado (Figura 1.38 B) foi observada em três indivíduos nos meses de novembro, abril e maio (primavera/outono). A hipertrofia do SSR (Figura 1.38 C e D) foi observada em 7 machos coletados nos meses de maio, junho (outono), julho, agosto (inverno) e janeiro (verão).

Figura 1.38 – Ciclo do Segmento Sexual Renal. Corte longitudinal. Hematoxilina-eosina. A) SSR hipotrofiado no verão (fevereiro; 10x); B) SSR moderadamente hipertrofiado no outono (abril; 10x); C) e D) SSR hipertrofiado no inverno (julho e agosto; 10x). As setas indicam os túbulos do SSR.

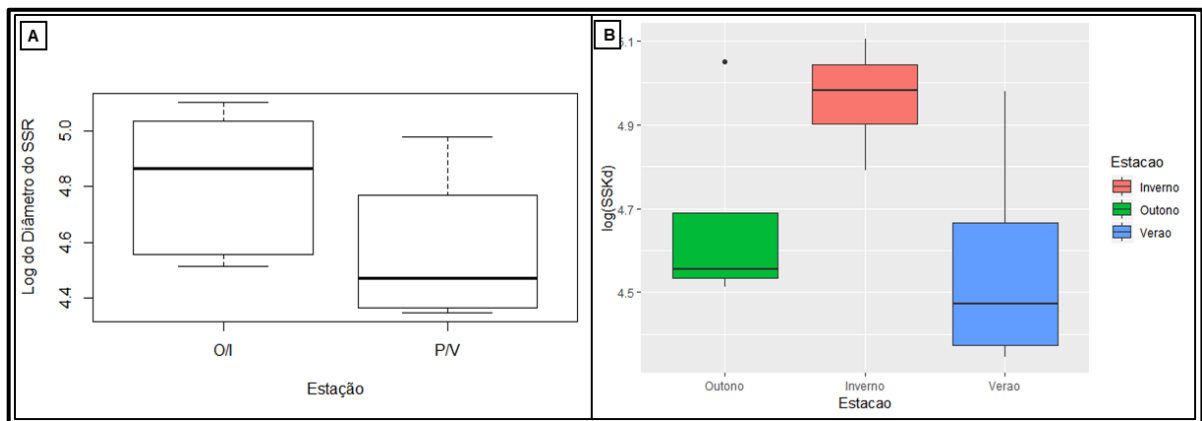


Fonte: SOUZA, E. 2020

Para a primeira análise, as medidas do diâmetro do túbulo do SSR não tiveram variação significativa entre as estações Outono/Inverno (O/I) e Primavera/Verão (P/V) ($t = 1.5587$, $gL = 10$, $p = 0,1501$; Figura 1.39 A). A média observada para a estação O/I foi de

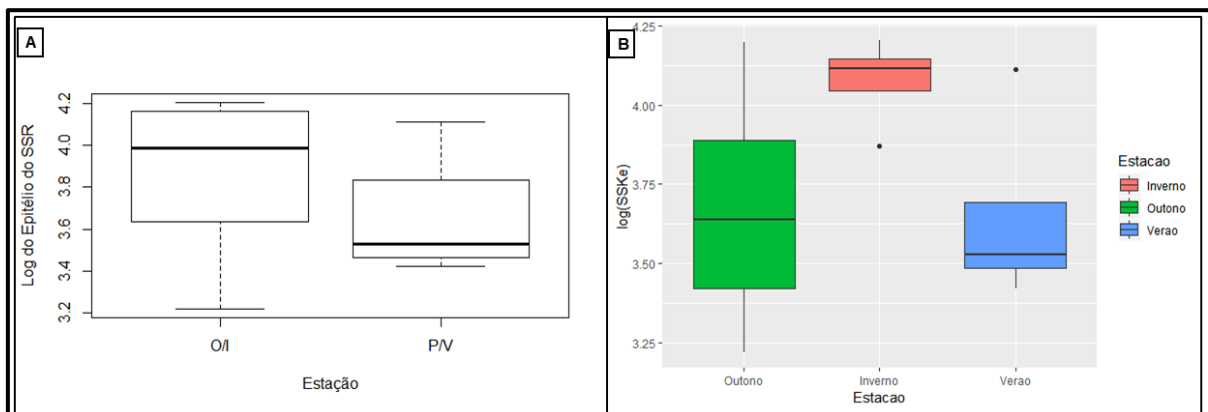
126,77 μm , maior do que a média de 99,56 μm observada para a estação P/V. Também não encontramos diferença significativa para a variação das medidas da altura do epitélio dos túbulos do SSR ($t = 1.0628$, $g\text{L} = 10$, $p = 0,3129$; Figura 1.40 A). A média observada para a estação O/I foi de 50,71 μm , maior do que a média de 39,97 μm observada para a estação P/V. Considerando as estações separadamente, também não foi verificada nenhuma diferença significativa tanto para as medidas do diâmetro do túbulo do SSR (ANOVA; $F = 3,048$, $p = 0,0975$; Figura 1.39 B) quanto para as medidas da altura do epitélio do túbulo do SSR (ANOVA; $F = 2,349$, $p = 0,151$; Figura 1.40 B).

Figura 1.39 – Média e variação do Log Diâmetro do Túbulo do SSR. A) Duas estações. O/I = outono/inverno; P/V = primavera/verão. B) Três estações. Verde = outono; Vermelho = Inverno; Azul = Verão. Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os limites máximo e mínimo observados.



Fonte: SOUZA, E. 2020.

Figura 1.40 – Média e variação do Log da altura do Epitélio do Túbulo do SSR. A) Duas estações. O/I = outono/inverno; P/V = primavera/verão. B) Três estações. Verde = outono; Vermelho = Inverno; Azul = Verão. Linhas horizontais no interior das caixas representam a média, limite das caixas o desvio padrão e linhas verticais os limites máximo e mínimo observados.



Fonte: SOUZA, E. 2020.

3.5 Ciclo reprodutivo das fêmeas

3.5.1 Análise macroscópica do trato reprodutivo feminino

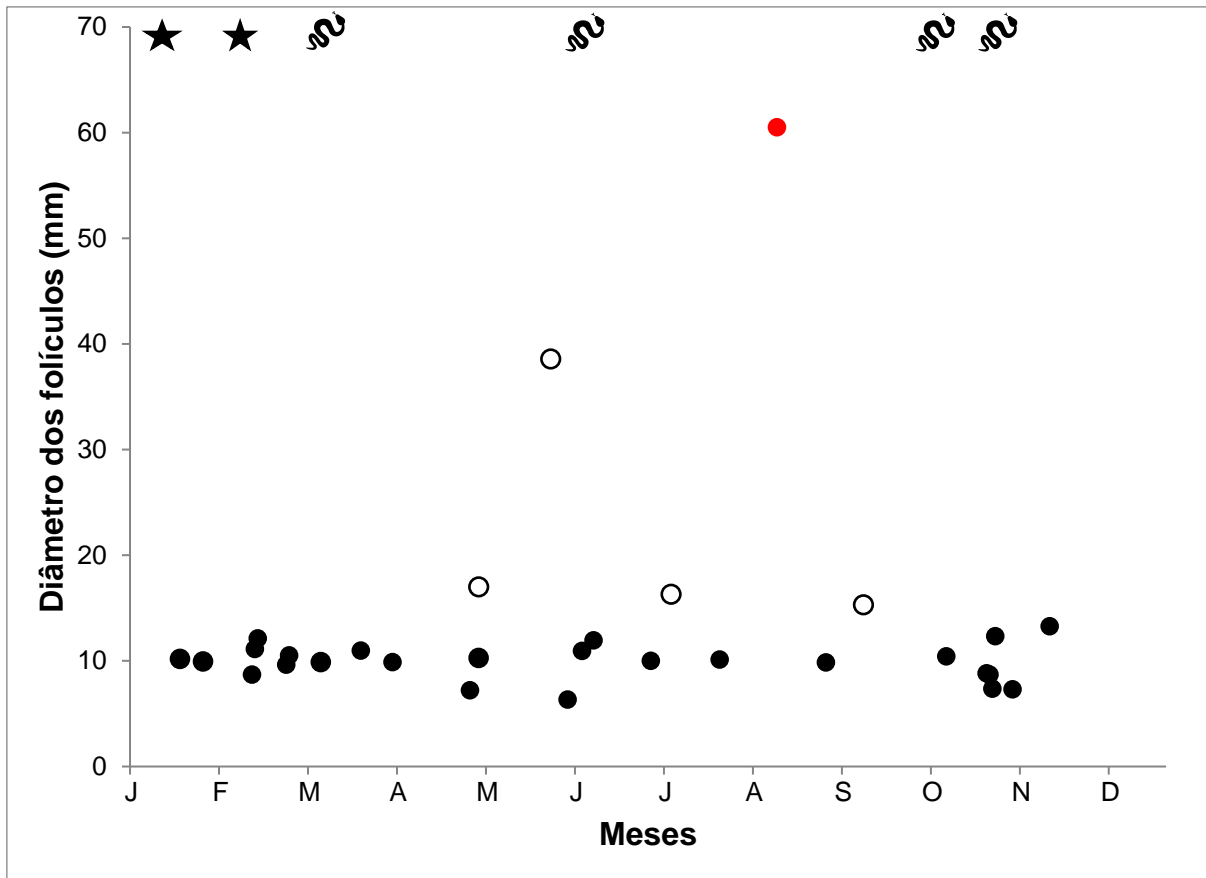
Um total de 73 fêmeas maduras foram avaliadas para a definição do ciclo reprodutivo, sendo 40 da FA e 33 da MA.

3.5.1.1 População da Floresta Amazônica (FA)

Folículos em vitelogênese primária (V1) foram observados ao longo de todos os meses do ano. Apenas 4 fêmeas em vitelogênese secundária (V2) foram encontradas. Uma delas em vitelogênese avançada (CRC = 1830 mm, maior folículo = 38,59 mm) foi coletada em maio, início da estação seca, com sete folículos em V2 no ovário direito e cinco no ovário esquerdo. As outras três fêmeas estavam em início do processo de vitelogênese secundária (CRC = 1830 mm e maior folículo = 16,99 mm; CRC = 2030 mm e maior folículo = 16,32 mm; CRC = 1790 mm e maior folículo = 15,32 mm) foram coletadas nos meses de maio, julho e setembro respectivamente, na estação seca. Apenas uma fêmea prenhe foi coletada no mês de agosto e continha 6 ovos no oviduto direito e 3 ovos no oviduto esquerdo (CRC = 1830 mm e maior ovo = 60,51 mm). O maior ovo foi dissecado e nenhum embrião foi encontrado, o que pode indicar início do desenvolvimento embrionário ou ovo atrésico.

Dentre os animais avaliados neste trabalho na FA, dois deles tinham comprimento dentro desse limite (57,5 cm e 59,8 cm) e foram considerados filhotes recém-nascidos. Estes foram coletados em janeiro e fevereiro, respectivamente. Outros quatro filhotes da amostra ultrapassaram 61 cm (65 cm, 68,1 cm, 68,4 cm e 76 cm) e foram considerados juvenis em primeiro ano de vida. Estes foram coletados nos meses de junho, março e outubro respectivamente. A figura 1.42 resume os resultados acima citados.

Figura 1.42 – Ciclo reprodutivo de fêmeas de *Lachesis muta* da Floresta Amazônica. Círculo fechado = vitelogênese primária; Círculo aberto = vitelogênese secundária; Círculo vermelho = fêmea prenhe; Estrelas = recém-nascidos; Serpentes = juvenis < 12 meses.



Fonte: SOUZA, E. 2020

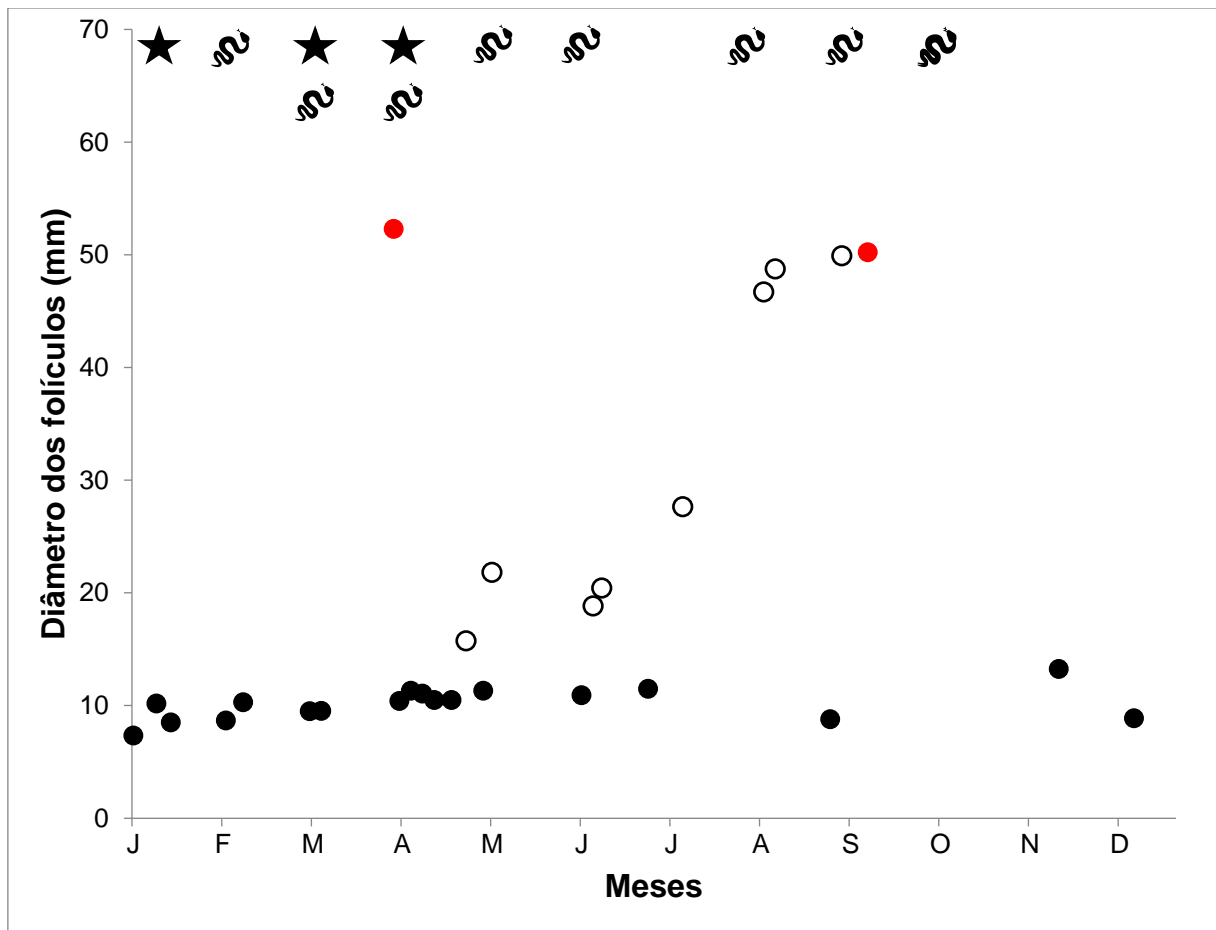
3.5.1.2 População da Mata Atlântica (MA)

Folículos em V1 foram observados ao longo de todo o ano. Oito fêmeas em V2 foram encontradas nos meses de abril (CRC = 1444 mm e maior folículo = 15,73 mm), maio (CRC = 1750 mm e maior folículo = 21,84 mm), junho (CRC = 1806 mm e maior folículo = 18,82 mm; CRC = 1686 mm e maior folículo = 20,42 mm), julho (CRC = 1570 mm e maior folículo = 27,63 mm), agosto (CRC = 2070 mm e maior folículo = 46,7 mm; CRC = 2200 mm e maior folículo = 48,74 mm) e setembro (CRC = 1565 mm e maior folículo = 49,91 mm), meses que representam as estações do outono e inverno na região da MA e que coincidem com a estação seca para a região da FA. Duas fêmeas prenhes foram coletadas, uma foi atropelada no mês de março e, devido ao estado de conservação, foi possível identificar apenas 4 ovos (CRC = 1790 mm e maior ovo = 52,29 mm). A segunda fêmea prenhe foi coletada no mês de

setembro e continha um total de 10 ovos (CRC = 1910 mm e maior ovo = 50,21 mm). Os ovos não foram dissecados.

Três animais tinham comprimento dentro do limite estipulado para recém-nascido (54,1 cm, 58,5 cm e 54,5 cm), e foram coletados em janeiro, março e abril, respectivamente. Outros 10 animais da amostra apresentaram tamanho total entre 61 cm e 122 cm e foram considerados juvenis em primeiro ano de vida. Estes foram coletados em fevereiro (111,3 cm), março (100,7 cm), abril (66,5 cm), maio (67,8 cm), junho (61,9 cm e 72,1 cm), agosto (75,2 cm e 86,6 cm), setembro (63,5 cm) e outubro (115,5 cm). A Figura 1.43 resume os resultados aqui apresentados.

Figura 1.43 – Ciclo reprodutivo de fêmeas de *Lachesis muta* da Mata Atlântica. Círculo fechado = vitelogênese primária; Círculo aberto = vitelogênese secundária; Círculo vermelho = fêmea prenhe; Estrelas = recém-nascidos; Serpentes = juvenis < 12 meses.



Fonte: SOUZA, E. 2020

3.5.2 Fecundidade

Os animais examinados estão listados na Tabela 1.4. O tamanho da ninhada não foi positivamente correlacionado com o tamanho do corpo materno ($t = -1,681$, $gL = 8$, $p = 0,1313$). Também não foi observado correlação entre o diâmetro do maior ovo ou folículo e o comprimento rostro-cloacal materno ($t = 1,8938$; $gL = 8$; $p = 0,09487$) ou o comprimento total ($t = 2,0167$; $gL = 8$; $p = 0,07846$).

Quando incluímos os dados da literatura, o resultado continuou não significativo entre o número de folículos/ovos com o tamanho do corpo materno ($t = -2,1551$ $gL = 12$, $p = 0,05217$) nem com o comprimento total ($t = -1,9527$; $gL = 8$; $p = 0,08663$), porém foi observado correlação positiva entre o diâmetro do maior ovo ou folículo e o comprimento rostro-cloacal materno ($t = 2,7708$; $gL = 11$; $p = 0,0182$; Figura 1.44), mas não com o comprimento total ($t = 2,0937$; $gL = 8$; $p = 0,06961$). Também não foi observada correlação negativa significativa entre o número de filhotes e o diâmetro do maior folículo ou ovo ($t = -1,2656$; $gL = 11$; $p = 0,2318$).

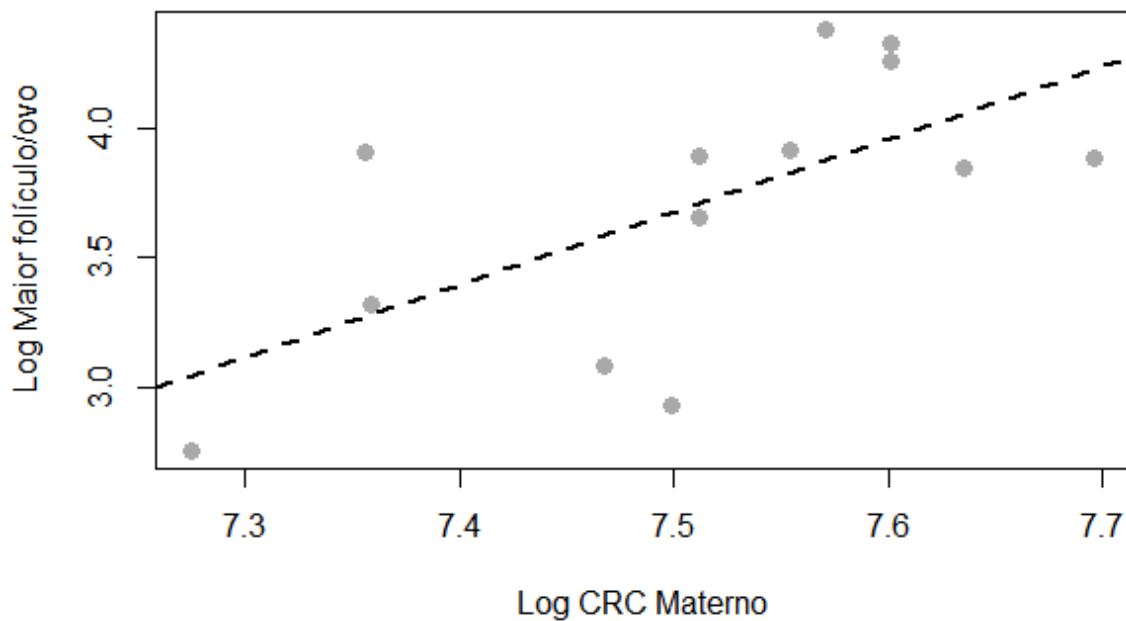
Tabela 1.4: Fêmeas analisadas de *Lachesis muta*. (Id e Coleção=número de tombo/ coleção; FA = Floresta Amazônica, MA = Mata Atlântica; CRC = comprimento rostro-cloacal; CT = comprimento total; F = fecundidade total; >FO = maior folículo ou ovo; ER = estágio reprodutivo; P = prenhe; V2 = vitelogênese secundária; (*) =tamanho do ovo na ovipostura.

Id e Coleção	Localidade	CRC mm	CT mm	F	>FO mm	ER	Autor(es)
45997/IBU	Manaus/AM	1830	2000	9	60,51	P	Este estudo
16514/MPEG	Marabá/PA	1830	2010	12	38,59	V2	Este estudo
2085/MZUESC	Ilheus/BA	2070	2236	9	46,7	V2	Este estudo
3014/MZUESC	Ilhéus/BA	1444	1579	18	15,73	V2	Este estudo
3123/MZUESC	Ilhéus/BA	2200	2355	14	48,74	V2	Este estudo
5359/MZUESC	Ilhéus/BA	1806	1948	10	18,82	V2	Este estudo
5442/MZUESC	Ilhéus/BA	1750	1884	12	21,84	V2	Este estudo
7430/MZUESC	Ilhéus/BA	1570	1701	13	27,63	V2	Este estudo
7803/MZUESC	Ilhéus/BA	1909	2060	10	50,21	P	Este estudo
9313/MZUESC	Ilhéus/BA	1565	1715	13	49,91	V2	Este estudo
-	FA	-	-	15	73,1*	P	Eisele, 2009
-	FA	1990	-	9	-	P	Corrales et al. 2016

3057/IBU	MA	1940	-	11	80*	P	Amaral, 1925
-	FA	2000	-	10	75,9*	P	Boyer et al. 1989
-	MA	2000	-	14	70,5*	P	Melgarejo et al. 1999

Fonte: SOUZA, E. 2020.

Figura 1.44 – Correlação entre o log do comprimento rostro-cloacal (CRC) materno e o log do diâmetro do maior folículo ou ovo de fêmeas de *L. muta*.



Fonte: SOUZA, E. 2020

3.5.3 Plug copulatório e estocagem de espermatozoides

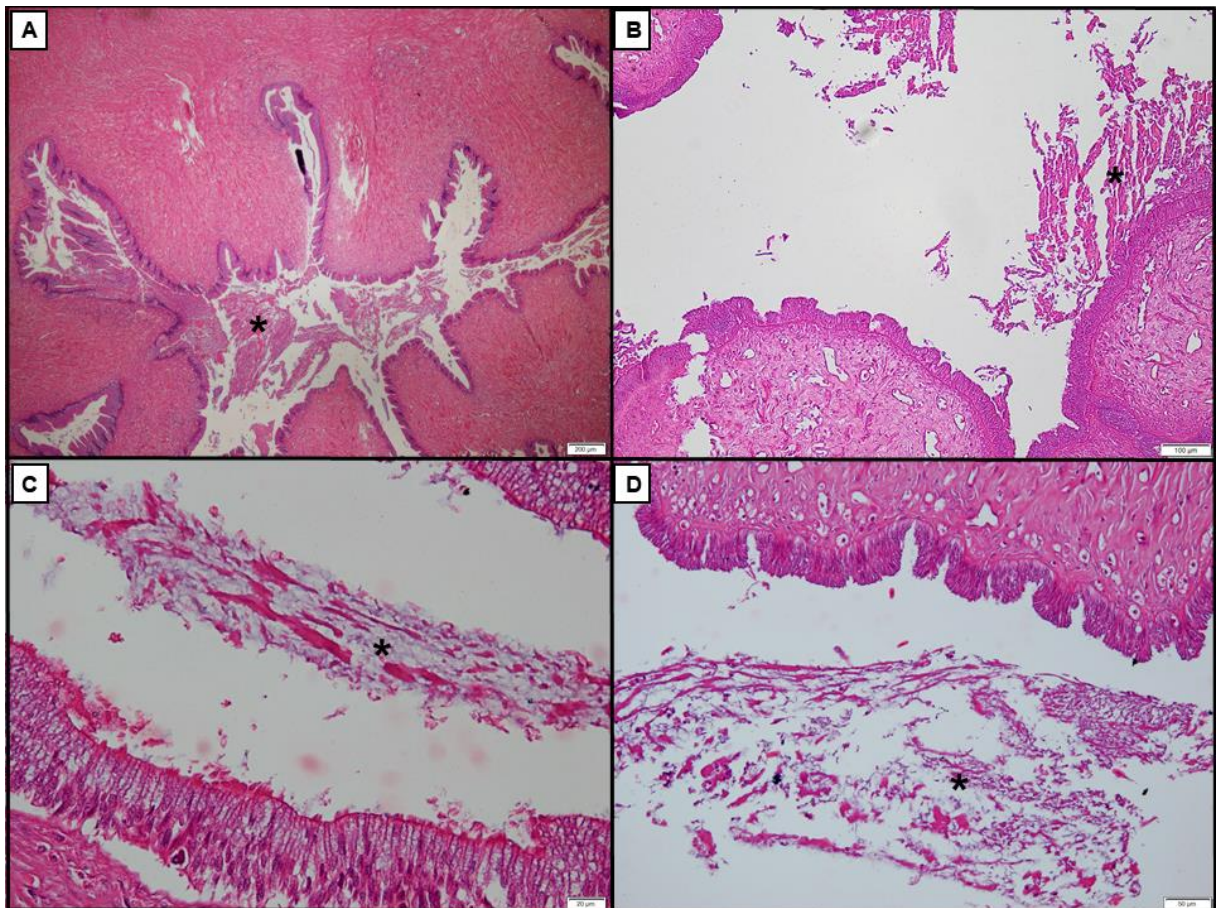
O presente trabalho relata pela primeira vez a presença de plug copulatório, estocagem de espermatozoides e formação do UMT (*Uterine Muscular Twisting*) no oviduto de uma espécie do gênero *Lachesis*.

O plug copulatório é um conjunto de substâncias, principalmente proteínas, produzidas no rim e depositadas pelo macho na cloaca da fêmea após a cópula. Essa estrutura atua tanto como uma barreira temporária, dificultando futuras cópulas, quanto evitando o vazamento de esperma pela cloaca da fêmea e garantindo, assim, que seus espermatozoides sejam fertilizados (BIRKHEAD; MØLLER, 1993; FRIESEN et al., 2013).

3.5.3.1 População da Floresta Amazônica

Foram encontradas quatro fêmeas com quantidades diferentes de plug na região da vagina. Uma fêmea estava em início de V2, coletada no mês de julho (Figura 1.45 A). Outra fêmea em início de V2 foi coletada no mês de setembro (Figura 1.45 B). As duas fêmeas restantes foram coletadas nos meses de maio e julho (Figuras 1.45 C e D, respectivamente), sendo que uma delas estava em V1 (Figura 1.45 D) e, para a outra, não foi possível determinar o estágio folicular. Não foram encontrados espermatozoides no plug ou em nenhuma outra região do oviduto dessas fêmeas.

Figura 1.45 – Plug copulatório na região vaginal de *L. muta* - FA. Corte longitudinal. Hematoxilina-Eosina. A) Fêmea em início de V2 (Julho; 4x); B) Fêmea em início de V2 (Setembro; 10x); C) (Maio; 40x); D) Fêmea em V1 (Julho; 20x). Asteriscos (*) indicam o plug copulatório.

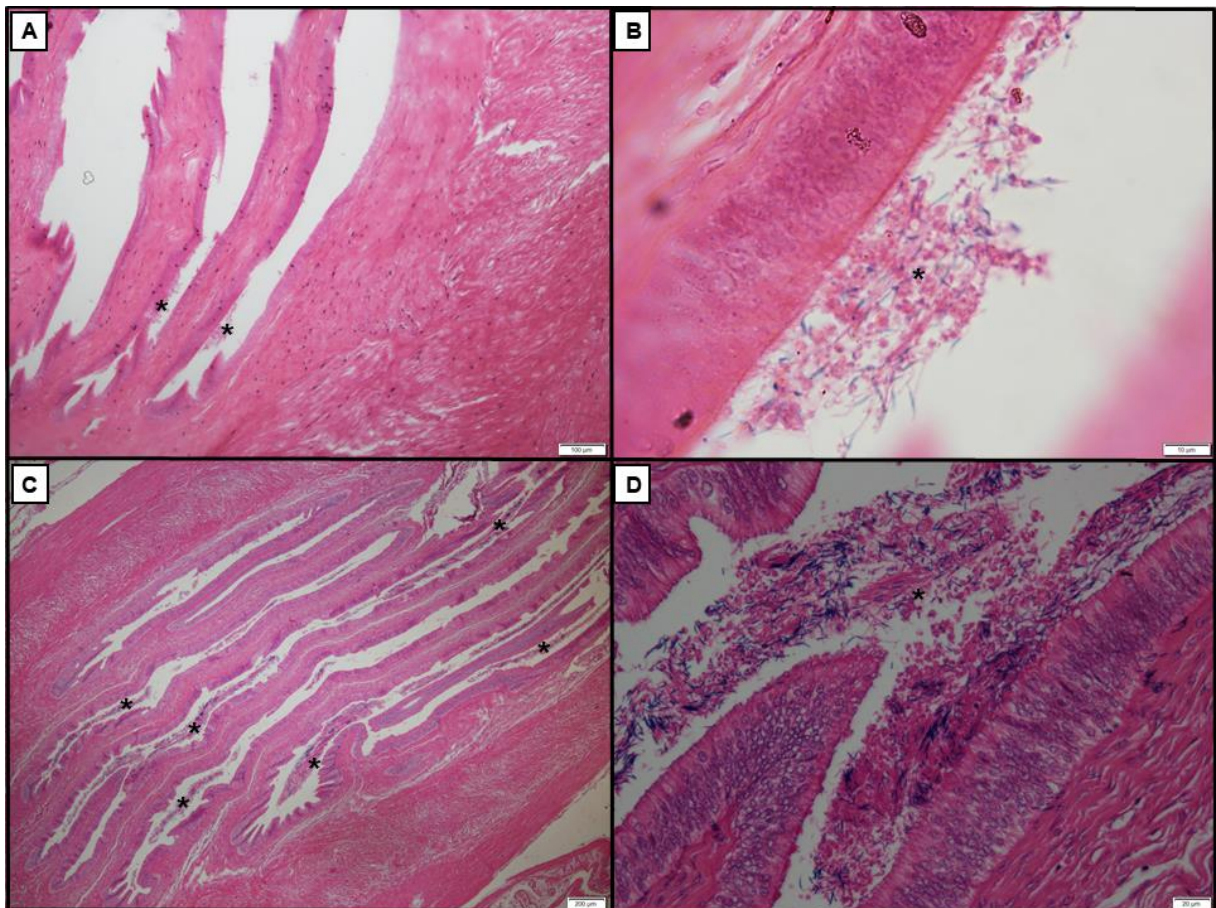


Fonte: SOUZA, E. 2020

A presença ou ausência de UMT foi avaliada em 19 fêmeas, das quais a estrutura foi observada em sete: uma prenhe, duas em vitelogênese secundária, três em vitelogênese primária e em uma não foi possível determinar o estágio reprodutivo. Foram encontrados

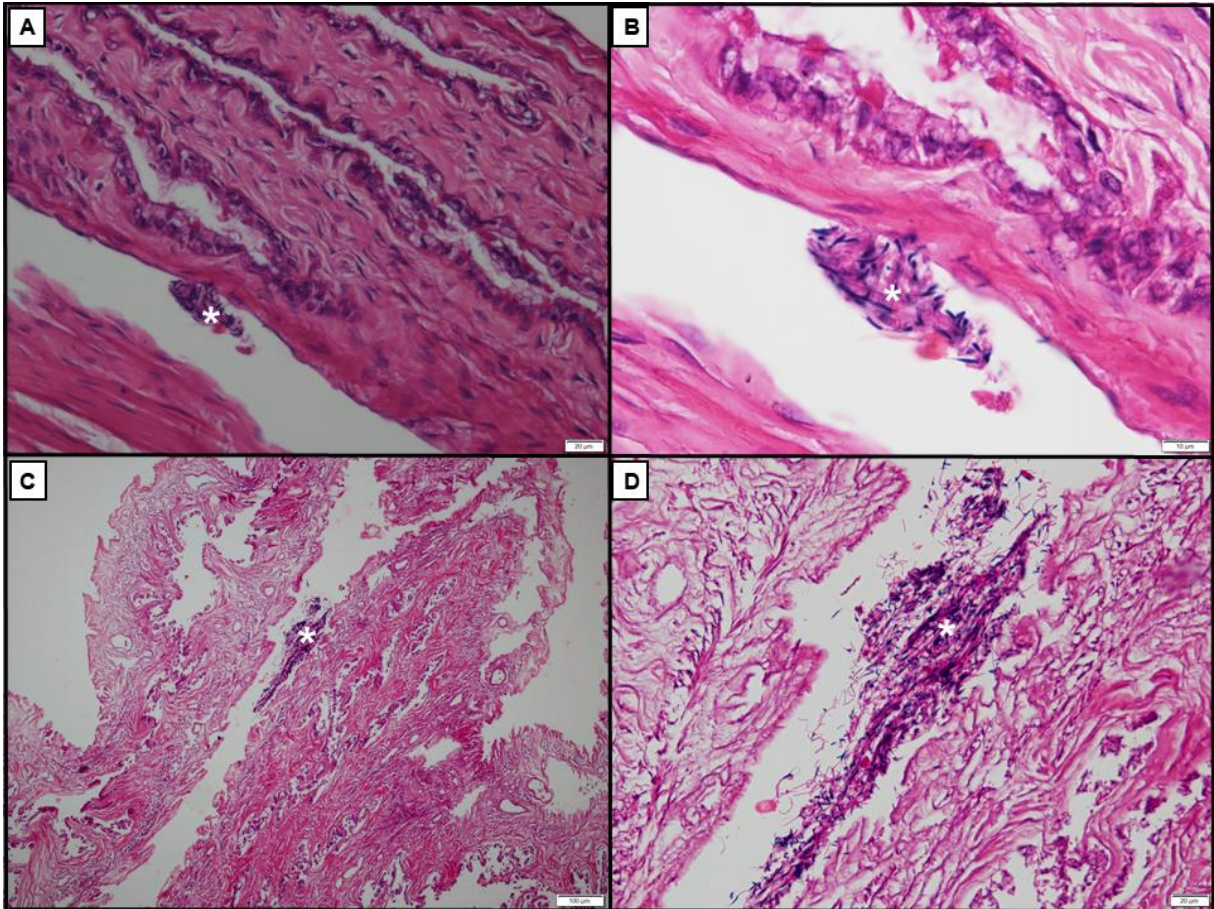
espermatozoides estocados na junção útero-vaginal da fêmea prenhe (Figura 1.46A e B) e de uma fêmea em vitelogênese secundária avançada (Figura 1.46C e D). Já no infundíbulo posterior, foi encontrado espermatozoide em uma fêmea em V1 (Figura 1.47 A e B) e em uma fêmea em V2 (Figura 1.47 C e D) coletadas em março e julho, respectivamente. Os espermatozoides encontrados no infundíbulo posterior não estavam estocados em receptáculos. Maiores detalhes sobre a UMT e a estratégia de estocagem de espermatozoides de *L. muta* estão no Capítulo 2 deste trabalho.

Figura 1.46 – Estocagem de espermatozoides na junção útero-vaginal (UMT) de *L. muta*. Corte longitudinal. Hematoxilina-Eosina. A) Vestígios de espermatozoides em fêmea prenhe (Agosto; 10x); B) Maior aumento de A (100x); C) Espermatozoides em fêmea em V2 (Maio; 4x); D) Maior aumento de C (40x). Asteriscos (*) indicam espermatozoides.



Fonte: SOUZA, E. 2020

Figura 1.47 – Estocagem de espermatozoides no infundíbulo posterior de *L. muta*. Corte longitudinal. Hematoxilina-Eosina. A) Fêmea em V1 (Março; 40x); B) Maior aumento de A (100x); C) Fêmea em V2 (Maio; 10x); D) Maior aumento de C (40x). Asteriscos (*) indicam espermatozoides.

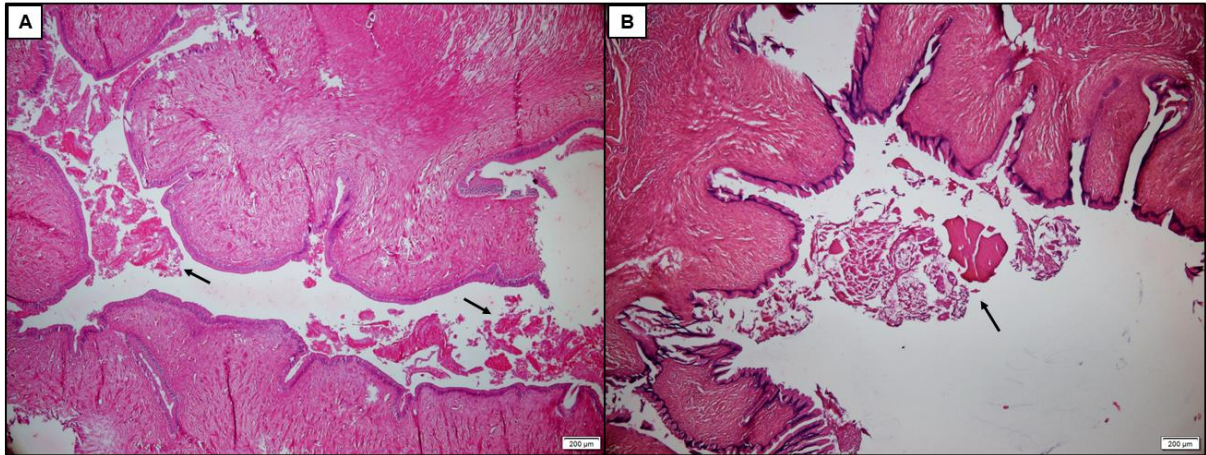


Fonte: SOUZA, E. 2020

3.5.3.2 População da Mata Atlântica

Foram encontradas duas fêmeas em V1 com quantidades diferentes de plug na região da vagina, uma coletada no mês de março (Figura 1.48 A) e a outra coletada no mês de dezembro (Figura 1.48 B). Não foram encontrados espermatozoides no plug ou em nenhuma outra região do oviduto dessas fêmeas.

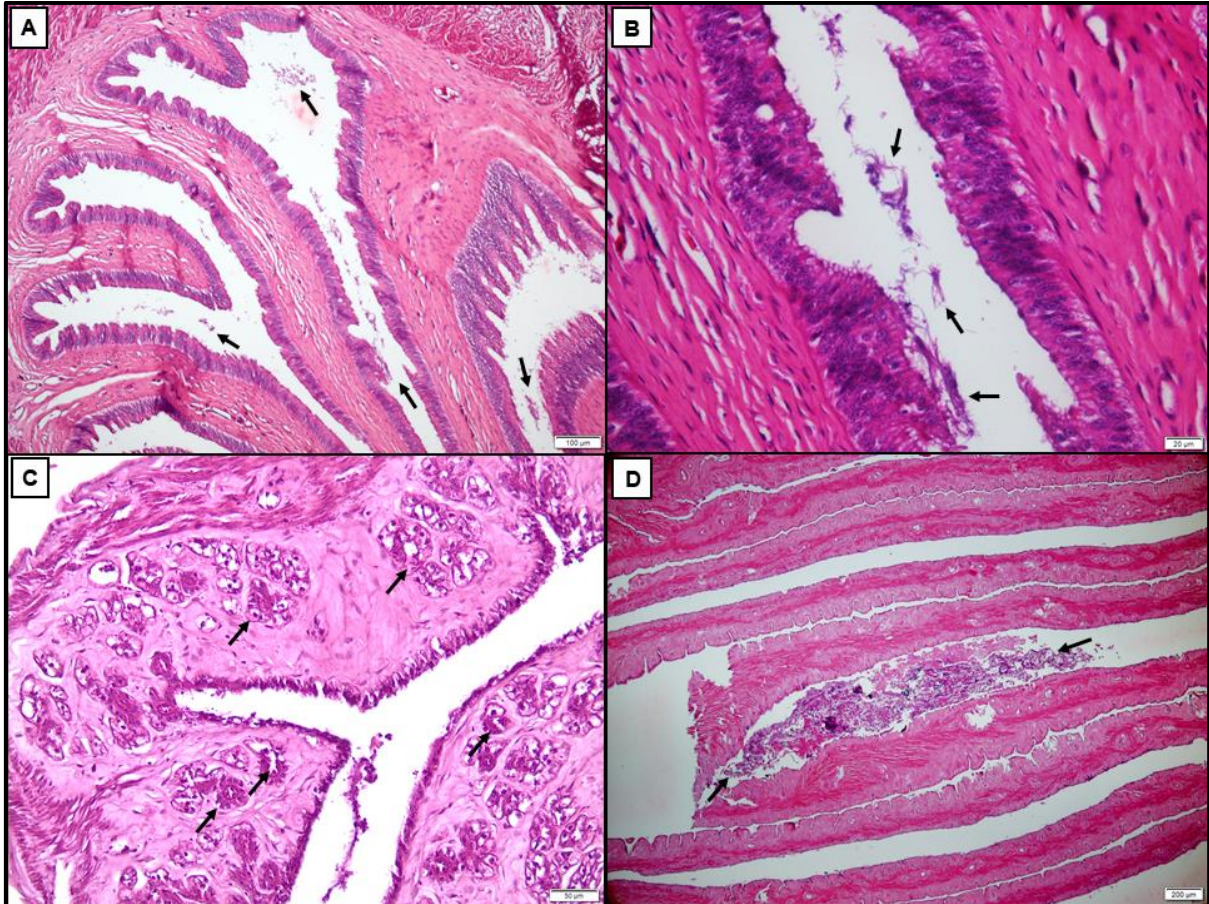
Figura 1.48 – Plug copulatório na região vaginal de *L. muta* - MA. Corte longitudinal. Hematoxilina-Eosina. A) Fêmea em V1 (Março; 4x); B) Fêmea em V1 (Dezembro; 4x); As setas indicam o plug copulatório.



Fonte: SOUZA, E. 2020

A presença ou ausência de UMT foi avaliada em 33 fêmeas da MA, das quais 8 apresentaram a estrutura. Quatro destas estavam em V1 e quatro em V2. Foi observada uma quantidade reduzida de espermatozoides em uma fêmea em V2 avançada coletada no mês de setembro (CRC: 1565 mm; maior folículo: 49,91 mm; Figura 1.49 A e B). No infundíbulo posterior, apesar de vários receptáculos seminais ciliados terem sido identificados (Figura 1.49 C), não foi observado espermatozoides dentro dessas estruturas em nenhum dos animais avaliados. Por outro lado, em uma fêmea prenhe coletada em março, foi encontrado uma substância volumosa não identificada (Figura 1.49 D). Essa massa pode ser derivada de um espermátóforo (MANN, 1984), porém não foi possível identificar espermatozoides dentro dessa substância devido a baixa qualidade de preservação do espécime.

Figura 1.49 – Estocagem de espermatozoides em *L. muta*. Corte longitudinal. Hematoxilina-Eosina. A) Fêmea em V2 com espermatozoides na -UMT (setas) (Setembro; 10x); B) Maior aumento de A (40x); C) Receptáculos seminais ciliados (setas) (20x); D) Substância não identificada (setas) no lúmen do infundíbulo posterior de uma fêmea prenhe (Março; 4x).

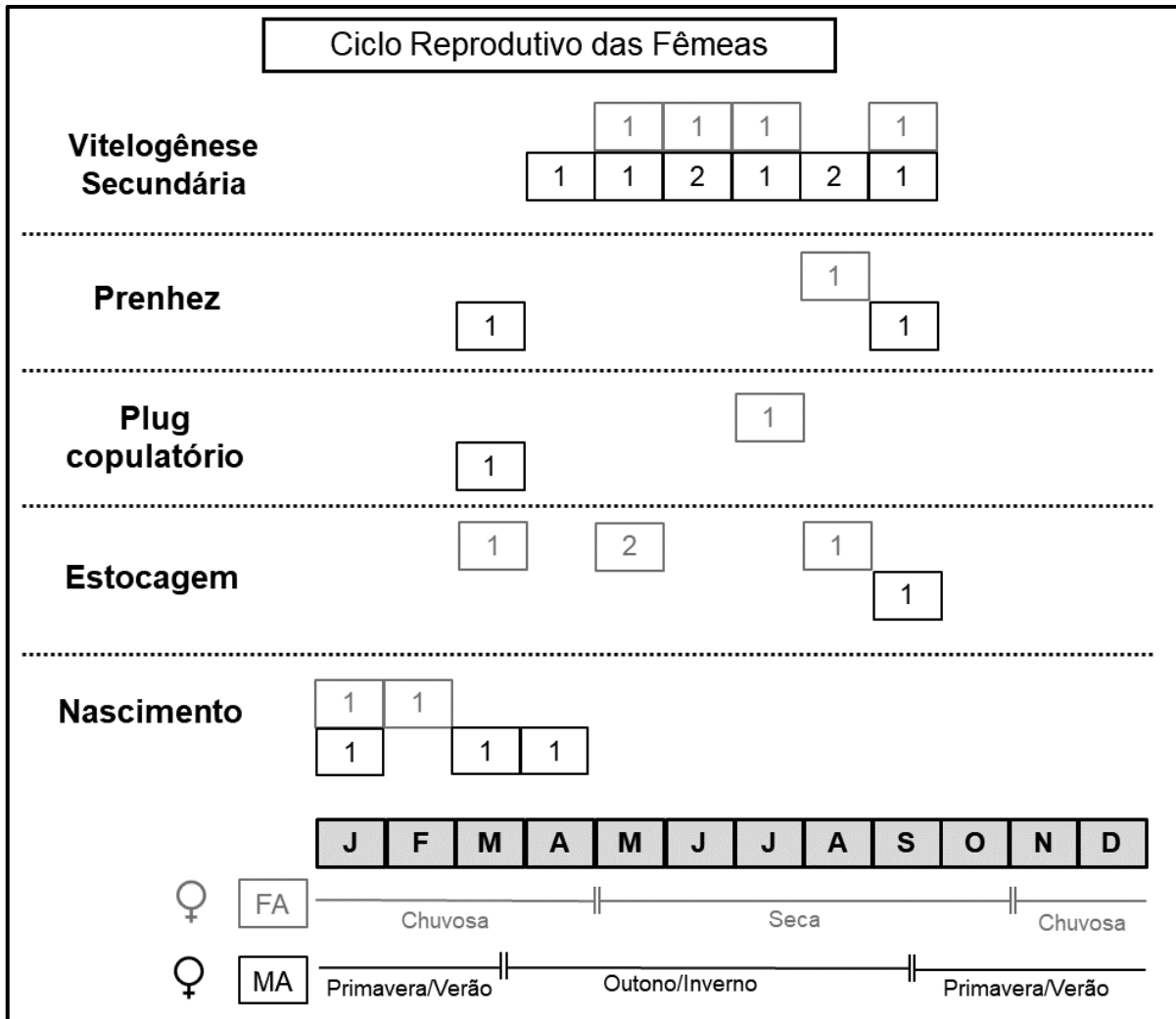


Fonte: SOUZA, E. 2020

3.6 Resumo do ciclo reprodutivo de fêmeas de *L. muta*

A Figura 1.50 resume as características do ciclo reprodutivo de fêmeas da surucucupico-de-jaca da Amazônia e da Mata Atlântica reunidas neste trabalho.

Figura 1.50 – Ciclo reprodutivo das fêmeas de *L. muta* da população da Floresta Amazônica (FA – cinza) e da Mata Atlântica (MA – preto). Os números dentro das caixas indicam o número amostral observado para cada fase do ciclo reprodutivo. As caixas estão sobrepostas ao respectivo mês de ocorrência.

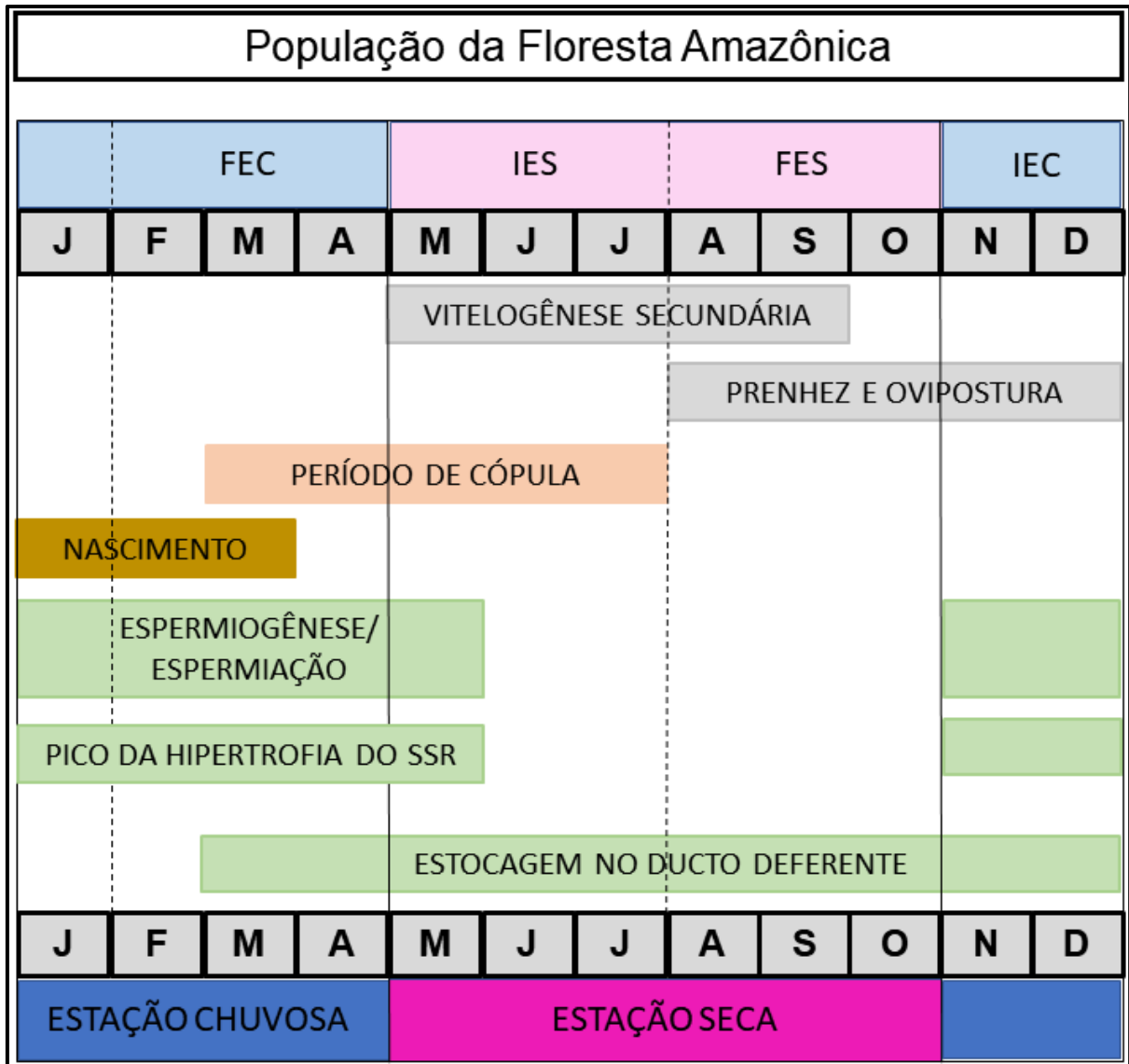


Fonte: SOUZA, E. 2020

3.7 Resumo do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de *L. muta* da população da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica

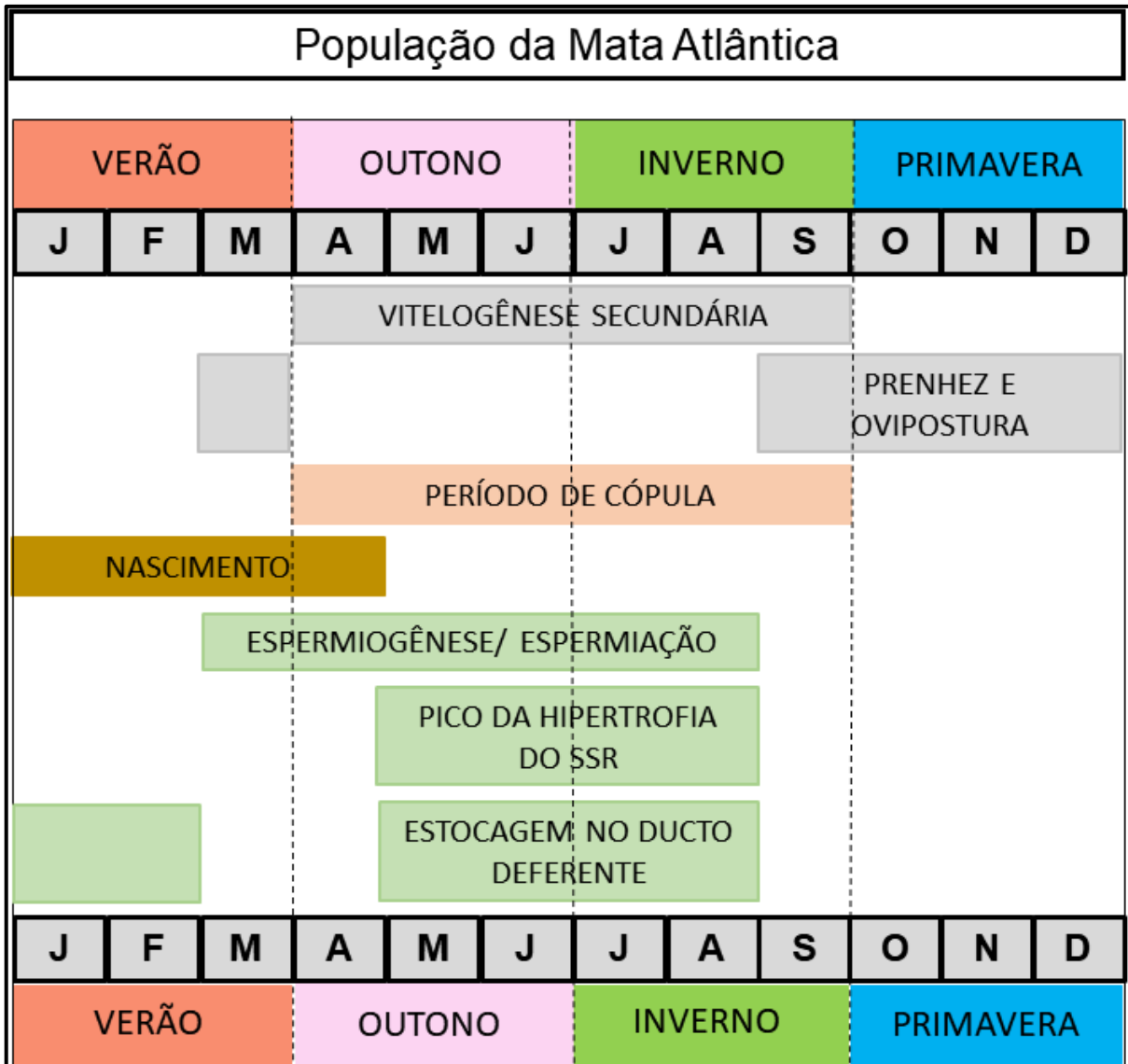
A Figura 1.51 e 1.52 mesclam os resultados deste trabalho referentes ao ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de *L. muta* da população da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica, respectivamente. O período de cópula foi inferido a partir da observação de plug copulatório e estocagem de espermatozoides nas fêmeas.

Figura 1.51 – Resumo do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de *L. muta* da população da Floresta Amazônica. FEC = Final da estação chuvosa; IES = Início da estação seca; FES = Final da estação seca; IEC = Início da estação chuvosa.



Fonte: SOUZA, E. 2020

Figura 1.52 – Resumo do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de *L. muta* da população da Mata Atlântica.



Fonte: SOUZA, E. 2020

4 DISCUSSÃO

4.1 Maturidade sexual, dimorfismo sexual e fecundidade

O tamanho do corpo e o crescimento de um animal podem ser resultado de forças evolutivas distintas difíceis de distinguir, uma vez que atuam tanto de forma independente, quanto em direções iguais ou opostas (BONNET et al., 2000). O produto pode ser resultado de seleção natural, e então o ganho na aptidão biológica se dá por questões ecológicas, como alimentação ou predação, por exemplo. No caso da seleção sexual, machos crescem mais do

que as fêmeas coespecíficas em espécies que apresentam o comportamento de combate entre machos quando comparado com espécies que não apresentam esse comportamento (SHINE, 1994). A seleção de fecundidade, por outro lado, prediz que o maior tamanho corporal das fêmeas aumenta sua capacidade na geração de prole, o que vem sendo comprovado em diversos estudos, principalmente com viperídeos neotropicais (BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a, 2014b; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; MARQUES; KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2013; NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003; SILVA et al., 2019a).

Adicionalmente, as relações de *trade-off* também influenciam os limites de tamanho dos animais, a idade em que atingem a maturidade sexual e a quantidade de filhotes que produzem (FORD; SEIGEL, 1994). Os *trade-offs* representam os custos pagos na aptidão biológica quando qualquer mudança benéfica em uma característica está ligada a uma mudança prejudicial em outra (STEARNS, 1989). Ou seja, são limites na história de vida moldadas ao longo da evolução que permitem que os seres vivos sejam hoje adaptados. Dois *trade-offs* bem documentados na biologia reprodutiva de serpentes são, por exemplo, crescimento *versus* maturidade sexual e número *versus* tamanho de filhotes. O balanço dessas forças evolutivas, assim como a influência de outros fatores externos, como a disponibilidade de alimentos (PEARSON; SHINE; HOW, 2002; STEARNS; KOELLA, 1986), determinam a direção e o nível de crescimento nos animais, assim como uma possível variação no crescimento dentro da mesma espécie (i.e., dimorfismo sexual).

Espécies do gênero *Lachesis* são consideradas as maiores dentre os viperídeos neotropicais, podendo ultrapassar 3 metros de comprimento (CAMPBELL; LAMAR, 2004). Neste trabalho, o maior indivíduo foi uma fêmea de 2,87 metros de comprimento total, coletada em Belém (PA) e preservada atualmente no Museu Paraense Emílio Goeldi. Nas duas populações, tanto machos quanto fêmeas atingem a maturidade sexual acima de um metro de comprimento, sendo o menor macho maduro da população amazônica de 1280 mm e da Mata Atlântica 1300 mm, e a menor fêmea da população amazônica de 1640 mm e da Mata Atlântica 1420 mm.

Espécies de surucucu se alimentam de mamíferos, especialmente roedores e marsupiais de pequeno porte (CAMPBELL; LAMAR, 2004). Apesar de serem serpentes grandes, suas presas são relativamente pequenas, e a proporção entre a massa presa/predador para essa espécie é considerada baixa dentre os viperídeos (MARTINS; OLIVEIRA, 1998). A alimentação de pequenos animais poderia ser um dos fatores a influenciar o crescimento mais lento e a maturidade tardia, uma resposta possível dentre a diversidade de cenários de *trade-*

off entre crescimento *versus* maturidade sexual (STEARNS; KOELLA, 1986). Além disso, estudos anteriores com viperídeos do Velho Mundo e da América do Norte demonstram forte convergência em algumas características, as quais incluem maturidade tardia (INEICH et al., 2006).

Lachesis muta apresenta dimorfismo sexual nas variáveis morfométricas de comprimento rostro-cloacal e comprimento da cauda para as duas populações, e os machos são significativamente maiores do que fêmeas. O índice do dimorfismo sexual (SSD) foi de -0,062 para a população da Floresta Amazônica e de -0,09 para a população da Mata Atlântica. Esse padrão também foi observado em outras espécies do mesmo gênero (RIPA, 1994, 2002), assim como em outras espécies da Família Viperidae (*Agkistrodon*, SIEGEL; SEVER, 2008; *Bitis*, SHINE et al., 1998; *Crotalus*, ALMEIDA-SANTOS et al. 1999; *Sistrurus*, BISHOP; FARRELL; MAY, 1996; *Vipera*, BONNET et al., 2000). No caso das espécies do gênero *Bothrops*, fêmeas são maiores do que os machos (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002). Comportamento de combate é descrito para ao menos três das quatro espécies de *Lachesis* em estudos de cativeiro: *L. stenophrys*, *L. melanocephala* e *L. muta* (RIPA, 1994; 2002). Em campo, dois machos de *L. muta* foram vistos em combate em uma região na Venezuela no mês de novembro (Diego Flores, comun. pessoal). Este comportamento ocorre durante a época de acasalamento e sua possível função é estabelecer relações de hierarquia que define acesso prioritário à cópula (ANDRÉN, 1986; SCHUETT, 1996, 1997). O resultado do SSD para *L. muta* corrobora com a predição de forças de seleção sexual atuando sobre o sistema de acasalamento, favorecendo maior crescimento de machos em comparação com fêmeas coespecíficas.

Além da seleção sexual, outro aspecto que pode ser relevante ao dimorfismo sexual é o modo reprodutivo (SHINE, 1994). A evolução da viviparidade parece estar relacionada com uma mudança no SSD, tendendo para fêmeas maiores do que machos. De fato, tanto *Lachesis* quanto as demais espécies da família Viperidae citadas que apresentam machos maiores do que as fêmeas coespecíficas exibem uma das duas características, isto é, oviparidade e/ou comportamento de combate (FENWICK; GREENE; PARKINSON, 2012).

Campbell e Lamar (2004) e Amaral (1925) afirmam que a fecundidade máxima para *Lachesis muta*, assim como para as outras espécies de *Lachesis*, seria de 20 ovos, porém consideram mais frequente o número médio de 6 a 11 ovos. Ripa (1994, 2002), em seus estudos com *L. melanocephala* e *L. stenophrys*, em cativeiro sugere fecundidade média de 9 a 13 ovos. Este mesmo autor relata ter encontrado 19 ovos de *L. melanocephala* em um buraco de paca. Fuentes e Corrales (2016) presenciaram a ovipostura de 14 ovos por uma fêmea de *L.*

acrochorda. Aqui, dentre as fêmeas prenhes encontradas, tivemos um número médio de 9,5 ovos por ninhada e, se considerarmos também as fêmeas em vitelogênese secundária, a fecundidade média seria de 12 ovos/folículos por ninhada. Ambos os achados corroboram com o sugerido pelos autores.

Comparando a fecundidade de *Lachesis muta* com outras espécies da família Viperidae a impressão é que apresentam fecundidade relativamente baixa considerando o comprimento do corpo materno. Algumas espécies de grande porte do grupo *Bothrops*, como *B. asper*, podem gerar de 3 a 86 filhotes por estação reprodutiva em fêmeas que variam de 1000 a 2230 mm de CRC (SASA; WASKO; LAMAR, 2009; SOLÓRZANO; CERDAS, 1989). Em *Crotalus durissus* é comum observar variação no número de filhotes dependendo da região onde a espécie ocorre (BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012). A população de *C. durissus* do sudeste do Brasil tem fêmeas menores e produz ninhadas menores (CRC materno: 985 ± 85 mm; número de filhotes: $11,7 \pm 5,1$, ALMEIDA-SANTOS, 2005) enquanto a população da América Central pode gerar de 17 a 29 filhotes por estação reprodutiva em fêmeas que variam de 1000 a 1600 mm de CRC (SOLÓRZANO; CERDAS, 1988). De modo geral, para estas e outras populações de serpentes, quanto maior o tamanho do corpo materno maior será o número de filhotes gerados em uma ninhada (BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014b; MARQUES, 1996; NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003; PIZZATTO; MARQUES, 2002; SILVA et al., 2019b; SHINE, 1994). Em outros casos, nenhuma correlação é observada entre essas duas variáveis (FORD; SEIGEL, 1989; PINTO; FERNANDES, 2013).

Uma análise incluindo diversos grupos de serpentes comprovou que a fecundidade relativa em espécies vivíparas é significativamente maior do que para espécies ovíparas (IVERSON, 1987). O autor relata que as espécies vivíparas estudadas tendem a produzir ninhadas maiores, porém com neonatos menores do que o observado em espécies ovíparas do mesmo grupo. Além disso, a evolução da viviparidade também demonstra tendência de deslocamento da direção do SSD para fêmeas maiores e, portanto, favorecendo um corpo que consiga gerar maior quantidade de prole (SHINE, 1994).

A partir dos dados aqui coletados, não foi possível identificar correlação significativa entre o número de ovos/folículos e o tamanho do corpo materno, mas sim entre o CRC materno e o diâmetro do maior ovo/folículo. Também observamos uma correlação negativa entre o número e o tamanho dos ovos/folículos que, apesar de não significativa, mostra uma tendência a corroborar com o *trade-off* entre número *versus* tamanho da ninhada.

Para a pico-de-jaca da Amazônia e da Mata Atlântica, sugerimos que a força evolutiva que influencia o tamanho do corpo desses animais seja a seleção sexual, evidenciado por machos maiores do que fêmeas e relatos de comportamento de combate. Aspectos da história natural, como a alimentação de presas com massa relativa menor, também podem estar relacionadas com o tamanho do corpo, assim como a maturidade tardia, porém tal hipótese carece de maior investigação. Além disso, o possível *trade-off* entre número e tamanho da ninhada, sugerido pela presença de ovos grandes e pouco numerosos e pela correlação encontrada entre o CRC materno e o diâmetro do maior folículo/ovo, podem estar relacionados com a baixa fecundidade nesse animal. Estudos futuros que busquem responder à estas questões devem considerar o aumento do número amostral.

4.2 Ciclos Reprodutivos

De acordo com Zamudio e Greene (1997), o grupo *Lachesis* possivelmente é descendente de linhagens de crotalíneos norte-americanos. Aspectos da biologia reprodutiva de algumas espécies de crotalíneos da América do Norte já foram estudados por alguns autores (*Agkistrodon*, ALDRIDGE; DUVALL, 2002; SIEGEL et al., 2008; *Crotalus*, SHUETT, 1992; *Sistrurus*, ALDRIDGE et al., 2008). De modo geral, os machos iniciam a espermatogênese no final da primavera/início do verão setentrional, finalizando no outono, estação que coincide com a cópula e com comportamentos de combate e corte. A hipertrofia do SSR é caracterizada pelo aumento da concentração de testosterona e coincide com o período de cópula. Para algumas espécies observam-se dois períodos de cópula: um no final do verão/início do outono, e outro na primavera após hibernação no inverno (ALDRIDGE; DUVALL, 2002). Para outras espécies, mantêm-se apenas o primeiro período.

As espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus durissus* são crotalíneos da América do Sul e Central, amplamente distribuídas nesses continentes e apresentam sazonalidade no ciclo reprodutivo (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; SOLORZANO; CERDAS, 1989). De modo geral, nas fêmeas, a vitelogênese secundária tem início nos meses de março e abril, no outono, que coincide com a cópula, e se estende até setembro e outubro, início da primavera. A sazonalidade desses eventos reprodutivos nas fêmeas de *Bothrops* corrobora com o padrão observado para fêmeas de crotalíneos da América do Norte, com a diferença de que, para as primeiras, não ocorre hibernação no inverno com o consequente intervalo no processo vitelogênico (ALDRIDGE; DUVALL, 2002). Em relação aos machos, estudos demonstram uma marcada sazonalidade

no ciclo espermatogênico, com a produção de espermatozoides concentrada em períodos mais quentes do ano e a ocorrência de um período de quiescência nos testículos (BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a,b; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2002; SILVA et al., 2019b), o que caracteriza um padrão cíclico e sazonal na produção de espermatozoides (MATHIES, 2011).

Pesquisadores que investigaram a biologia reprodutiva de espécies do gênero *Lachesis* afirmam que os eventos reprodutivos são desencadeados por baixas temperaturas e/ou aumento da umidade. De acordo com Solórzano (2004), o período de cópula para *Lachesis stenophrys*, a surucucu da margem Atlântica da Costa Rica, se dá entre os meses de fevereiro e março, período de baixa precipitação e baixas temperaturas na região, e os ovos são depositados nos meses de junho até agosto, estação quente e chuvosa. Em cativeiro, o comportamento de corte e cópula foi observado entre os meses de dezembro e fevereiro, e a ovipostura de junho até agosto, e nascimentos em setembro e outubro (CORRALES et al., 2014). Em maio de 1995, uma fêmea prenhe foi recebida no Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica (CHACÓN; VALVERDE, 2004). Em agosto, essa fêmea fez a ovipostura de 11 ovos, os quais eclodiram em novembro, corroborando o sugerido por Solórzano (2004).

Lachesis melanocephala, a surucucu da margem Pacífica da Costa Rica e Panamá, foi estudada em cativeiro por Ripa (1994, 1999). A primeira cópula foi vista em janeiro, estação seca. O autor relata que “foi uma das cópulas mais violentas que já testemunhou em serpentes”. A ovipostura de 13 ovos ocorreu em abril, início da estação chuvosa, e o nascimento em junho. Um segundo casal de *L. melanocephala* copulou entre os meses de fevereiro e março, estação seca, e 9 ovos foram encontrados em maio, seguido de nascimento em julho, estação chuvosa.

Lachesis achrocorda, a verrugosa como é conhecida regionalmente, distribui-se pelo Panamá, Colômbia e Equador. Indivíduos dessa espécie foram reproduzidos em cativeiro pela primeira vez sob condições climáticas naturais de Medellín, Colômbia, cuja estação chuvosa concentra-se entre os meses de maio até novembro e a estação seca de dezembro até abril (HENAO; CORRALES, 2015). Comportamentos de corte foram vistos no mês de junho e, no final de setembro a fêmea foi encontrada enrolada ao redor de 11 ovos. No 93º dia de incubação (24 de dezembro de 2013), sete neonatos eclodiram. Fuentes e Corrales (2016) encontraram 14 ovos recém eclodidos em uma viagem de campo no Panamá no mês de setembro (estação chuvosa). Alguns meses depois, em janeiro (estação seca) uma fêmea prenhe foi coletada na mesma localidade e levada ao laboratório, onde fez a ovipostura de 13

ovos um mês depois (estação seca). Os neonatos eclodiram 70 dias depois de terem sido incubados artificialmente, no início da estação chuvosa.

Para *Lachesis muta*, autores também relacionam a época de cópula com períodos de queda na temperatura e/ou aumento da umidade. De Souza (2007) mantém um cativeiro semi-extensivo no sul da Bahia, onde os animais conseguem vivenciar de forma natural as condições climáticas da região. O autor afirma que “não existe época de reprodução para surucucus na natureza”. Para confirmar essa afirmação, o autor cita que a cópula já foi observada em estações distintas, no mês de setembro, inverno, e janeiro “durante uma frente fria inesperada”.

A partir de outras observações em cativeiro (BOYER; MITCHELL; MURPHY, 1989; CORRALES; GÓMEZ; FLORES, 2016; RIPA, 1994, 2002; TURNER; CARMICHAEL; SOUZA, 2008), os autores afirmam que frentes frias parecem ser um gatilho para a reprodução nessa espécie. Em um trabalho de campo, Diego Flores (comunicação pessoal) encontrou um casal de *L. muta* copulando no município de Caripe, Venezuela, no dia 10 de novembro de 2012. Dois machos foram vistos em ritual de combate no mesmo mês. A altitude no local era de 2100 m, a temperatura variava entre 14-20°C e não ocorriam chuvas há pelo menos duas semanas. Oito neonatos foram encontrados nessa mesma área ao longo de vários meses do ano entre 2011 e 2013 (CORRALES; GÓMEZ; FLORES, 2016). Os autores sugerem que esses dados de campo corroboram com um padrão reprodutivo sazonal para a espécie. Por outro lado, em análise histológica das gônadas (ALVES; ARGÔLO; CARVALHO, 2014), a espermatogênese foi observada nos meses de junho e julho (inverno) e em janeiro (verão), e os autores indicam sazonalidade no ciclo reprodutivo de machos e fêmeas, em que o período de produção de gametas coincide com o período de cópula.

O fato de os comportamentos reprodutivos e cópula serem desencadeados por baixa temperatura não significa que não exista sazonalidade no ciclo reprodutivo. Na realidade, o início da atividade reprodutiva é sinalizado por estímulos ambientais sazonais tais como fotoperíodo, temperatura ou precipitação (FARNER, 1986; PERRINS, 1970; PERRINS; BIRKHEAD, 1983; WINGFIELD, 1980). Mudanças nesses estímulos são detectados pelo organismo em níveis sensoriais, traduzidos pelo sistema endócrino para sinais hormonais que, por sua vez, comunicam a informação ao sistema reprodutivo (WILSON; DONHAM, 1988; WINGFIELD, 1983). Aldridge (1975), ao estudar uma população de *Crotalus v. viridis*, afirmou que a espermatogênese tinha início em épocas com temperaturas mais elevadas. Para *Arizona elegans* (ALDRIDGE, 1979) e *Nerodia sipedon* (WEIL; ALDRIDGE, 1979) o gatilho para o início da espermatogênese também teve relação com a temperatura.

Os dados apresentados neste trabalho indicam fortemente que o ciclo reprodutivo de *L. muta* é sazonal para machos e fêmeas, assim como o descrito para os demais crotalíneos neotropicais. De acordo com os dados histológicos e com as medidas microscópicas do túbulo seminífero, o começo da espermatogênese ocorre no início da estação chuvosa (novembro) e a espermição vai até o final dessa estação (abril/maio) para a população da FA. A quiescência testicular foi observada no final da estação seca (setembro e outubro). Esses dados corroboram o padrão observado para os demais crotalíneos da América do Sul e do Norte. Já para a população da MA, a espermatogênese está mais concentrada nos meses de outono e inverno (maio/junho), e a quiescência no final da primavera e verão (novembro, dezembro e fevereiro). Classificamos o ciclo reprodutivo dos machos de *L. muta* da região Amazônica e da Mata Atlântica como descontínuo cíclico sazonal semi-sincrônico (MATHIES, 2011).

A estocagem no ducto deferente não demonstra sazonalidade, já que encontramos o lúmen cheio de espermatozoides em todos os meses amostrados e o diâmetro do ducto não teve diferença entre as estações nas duas populações. Para a população da FA, ducto deferente com quantidade reduzida de espermatozoides foi observado entre os meses de abril e julho, o que pode indicar que o período de cópula ocorre nesse período (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; JOHNSON; JACOB; TORRANCE, 1982). A hipertrofia do segmento sexual renal (SSR) mostra um padrão relativamente assincrônico entre os indivíduos das duas populações. De acordo com as análises histológicas e as medidas microscópicas, a hipertrofia no SSR ocorre durante a estação chuvosa (novembro a abril) para a população da FA, coincidindo com a espermatogênese. Para a população da MA, a maioria dos indivíduos apresentaram hipertrofia do SSR no outono e inverno (maio a agosto), coincidindo com a espermatogênese e com o período de cópula, porém essa observação não teve respaldo estatístico e carece de maior investigação.

Fêmeas em vitelogênese secundária concentraram-se entre os mesmos meses nas duas populações: de abril a setembro (estação seca na região amazônica, outono e inverno na Mata Atlântica). De acordo com Mathies (2011), este padrão caracteriza um ciclo descontínuo cíclico sazonal sincrônico para as duas populações. Nesse sentido, discordamos que o ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de *L. muta* seja asazonal, como indicado pelos autores (BOYER; MITCHELL; MURPHY, 1989; CORRALES; GÓMEZ; FLORES, 2016; RIPA, 1994, 2002; TURNER; CARMICHAEL; SOUZA, 2008), porém concordamos que o período de cópula esteja concentrado em épocas de queda na temperatura e baixa precipitação (no caso da Amazônia) e queda na temperatura e alta precipitação (Mata Atlântica), coincidindo com os meses de maio até setembro nas duas regiões. A observação de fêmeas em

vitelogenese secundária de maio até setembro corrobora essa hipótese, uma vez que as fêmeas ficam mais receptivas à cópula durante essa fase do ciclo reprodutivo (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; BASSI; COETI; ALMEIDA-SANTOS, 2020). Resultados sobre o período de atividade também sugerem que esse seja o período de cópula, pois machos foram mais encontrados em maio e junho (FA) e julho e agosto (MA). Os machos de diversas espécies exibem um pico de atividade durante a época de cópula, que está relacionado com comportamentos de combate e de procura pela fêmea (ALDRIDGE; BROWN, 1995; ALMEIDA-SANTOS et al., 2017), comportamentos verificados em estudos anteriores para as espécies do gênero *Lachesis*. Além disso, esse mesmo período também coincide com a observação de plug copulatório e espermatozoides no oviduto das fêmeas das duas populações, reforçando a suposição de que essa seja a época de cópula.

Nossos resultados apontam evidências inéditas de que essa espécie possui estratégia de estocagem de espermatozoides. Túbulos de estocagem de espermatozoides foram observados na região do infundíbulo posterior em todas as épocas do ano para as fêmeas das duas populações. Além disso, quantidades diferentes de espermatozoides foram observadas tanto na região do útero aglandular quanto no infundíbulo posterior, indicando uma estratégia de estocagem de longo prazo (*long-term sperm storage* – LTSS). A estocagem de espermatozoides já foi observada para várias espécies da família Viperidae e da subfamília Crotalinae e parece ser uma estratégia obrigatória, uma vez que o período de cópula (outono/inverno) está dissociado do período de ovulação (primavera) nessas espécies (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997, 2002; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; SIEGEL; SEVER, 2008). Nossos resultados sugerem que essa estratégia também é obrigatória para *L. muta* já que o período de cópula e ovulação estão dissociados, e indica um caráter conservativo para o grupo.

Para crotalíneos, a época de nascimento em períodos mais quentes e úmidos do ano pode ser considerado um caráter adaptativo, pois nessa época é provável que os filhotes tenham maiores chances de sobrevivência graças às melhores condições climáticas e de oferta de alimento (FITCH, 1982). Além disso, o desenvolvimento embrionário necessita de condições fisiológicas adequadas, tais como umidade, temperatura e trocas gasosas (SHINE; THOMPSON, 2006). Na população da Mata Atlântica, uma fêmea prenhe foi encontrada em setembro (final do inverno), e outra em março (final do verão). Nessa região, as estações com temperaturas mais elevadas são também as com menor índice pluviométrico, e vice-versa (MENDONÇA; DANNI-OLIVEIRA, 2007). Talvez essa característica confira uma certa plasticidade na época de nascimento dos filhotes nessa região, que poderão encontrar

temperaturas altas ou umidade alta alternadamente ao longo de todo o ano. Já na Amazônia, filhotes de *L. muta* foram coletados nos meses de janeiro e fevereiro, coincidindo com os meses mais quentes e úmidos do ano, e uma fêmea prenhe foi coletada em agosto (estação seca). Esse resultado corrobora o encontrado para a maioria dos crotalíneos neotropicais, porém se contrapõe ao observado para *Bothrops atrox* (SILVA et al., 2019a), um crotalíneo simpátrico à surucucu na Floresta Amazônica cujo período de nascimento é observado ao longo de todo o ano, porém é mais frequente durante a estação seca (agosto a outubro).

Espécies filogeneticamente relacionadas que ocorrem em simpatria podem apresentar diferenças entre os principais eixos da composição do nicho: tempo, espaço e/ou alimento (PIANKA, 1986). Em relação ao tempo, serpentes podem apresentar variação sazonal na atividade de vida (ROCHA et al., 2014), em geral relacionada com eventos reprodutivos. A diferença na época de recrutamento dos filhotes de *L. muta* e *B. atrox* não deve ser resultado de partição de nicho entre duas espécies que coabitam, uma vez que os filhotes dessas espécies não competem pelos mesmos recursos (MARTINS; OLIVEIRA, 1998). Uma hipótese alternativa é que essa diferença seja consequência dos modos reprodutivos distintos das duas espécies. *B. atrox*, vivípara, teria maior independência das condições do meio para o desenvolvimento embrionário, enquanto a ovípara *L. muta* deve garantir condições do meio adequadas para o desenvolvimento dos ovos (GRIFFITH et al., 2015; SHINE, 2014), ou seja, alta temperatura e/ou umidade. Entretanto, tanto a hipótese de plasticidade na Mata Atlântica quanto a hipótese conservativa na Floresta Amazônica necessitam de maior investigação.

A exposição dos ovos de *L. muta* a diferentes temperaturas pode alterar o tempo de incubação, porém, não se sabe a temperatura limite em que o desenvolvimento embrionário é comprometido. Em uma temperatura de 30-31°C o tempo de incubação foi 61 dias (BOYER; MITCHELL; MURPHY, 1989) e, mantidos a 25°C, o tempo foi de 74 a 79 dias (DE SOUZA, 2007). Também não existem dados comparativos em relação à umidade. O único estudo que faz menção a essa condição (CORRALES; GOMÉZ; FLORES, 2016) manteve os ovos dentro de um intervalo de 77-88% de umidade e 26-30°C, e obteve um tempo de incubação de 75 dias. Estudos futuros devem considerar o teste do desenvolvimento embrionário dos ovos de *L. muta* em diferentes condições de temperatura e umidade para averiguar ocorrem limitações do desenvolvimento. Assim, será possível inferir se tais limitações influenciam em diferenças entre o período de recrutamento dos filhotes na natureza na região da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica.

4.3 Frequência Reprodutiva

A frequência reprodutiva diz respeito a quantidade de vezes que machos e fêmeas se reproduzem (i.e., geram prole) ao longo de sua vida. Evidentemente, a frequência reprodutiva observada para as fêmeas raramente será igual a observada para os machos coespecíficos, uma vez que estes são capazes de se reproduzir continuamente uma vez que atingem a maturidade sexual (SAINT GIRONS, 1982; SHINE, 2003). As serpentes são classificadas como “capital breeders” (BONNET et al., 1998), ou seja, não iniciam as atividades reprodutivas até acumularem uma quantidade energética suficiente para tal. Após o primeiro episódio reprodutivo, as fêmeas podem demorar um, dois ou até mais anos para recuperar o investimento energético inicial e dar início a um segundo episódio reprodutivo (BLEM, 1982). Portanto, para algumas espécies, inclusive muitos viperídeos (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; BONNET et al., 2002; SUEIRO, 2013), a reprodução ocorre em anos alternados, onde um ano é destinado para vitelogênese, cópula e parturição, e no outro ocorre a recaptação energética. Possivelmente, as razões para isso decorrem de uma combinação de fatores relacionados à disponibilidade de alimentos, reservas de gordura abdominal, duração da estação reprodutiva e estrutura populacional (BLEM, 1982; BONNET et al., 2002; SEIGEL; FORD, 1987).

Estudos em cativeiro indicam que a duração da estação reprodutiva para *Lachesis muta* é extensa. Ripa (1994) reportou um período de gestação de 101 dias para *L. melanocephala* e *L. stenophrys* a partir da data de cópula até a data da ovipostura. Um período bastante similar é verificado para *L. muta* por alguns autores em estudos em cativeiro (MELGAREJO; CUNHA; AGUIAR, 1999; DE SOUZA, 2007; EISELE, 2009; CORRALES; GÓMEZ; FLORES, 2016). Entretanto, esse período desconsidera o término da maturação folicular e a estocagem de espermatozoides verificada neste trabalho e, portanto, o tempo de gestação *per se* deve ser menor do que o sugerido pelos autores. A gestação não é o único fator influenciando a duração da estação reprodutiva para esse grupo. Os autores também relatam que fêmeas e, muitas vezes até os machos (DE SOUZA, 2007; TURNER; CARMICHAEL; SOUZA, 2008) guardam os ovos até a eclosão dos filhotes, comportamento conhecido como cuidado parental que ainda carece de investigação para essa espécie. Não sabemos quanto tempo demora para os filhotes nascerem sob condições naturais. Com base nos mesmos estudos em cativeiro, uma média de 75 dias parece razoável. Em alguns casos, também foi relatado que as fêmeas começam a recusar alimentação em média 4 semanas após

a cópula (EISELE, 2009; CORRALES; GÓMEZ; FLORES, 2016), e permanece sem se alimentar até que os ovos sejam retirados de seus cuidados pelos cuidadores.

Portanto, considerando o período de gestação, ovipostura e cuidado parental, fêmeas de *L. muta* podem ficar até sete meses sem se alimentar. Ainda de acordo com alguns desses autores, entre 798,9 g (10 ovos; BOYER; MITCHELL; MURPHY, 1989) e 1440 g (18 ovos; DE SOUZA, 2007) de massa total da ninhada são perdidos pela fêmea na ovipostura. Mesmo sob condições de cativeiro, ou seja, recebendo alimentação e cuidados periodicamente, uma mesma fêmea se reproduziu por dois anos seguidos e depois ficou três anos sem se reproduzir (CORRALES; GÓMEZ; FLORES, 2016). Estes autores ainda relatam que houve uma evidente diminuição no número de ovos em eventos reprodutivos consecutivos sendo que, na quarta ovipostura, todos os ovos estavam inférteis.

Considerando essas informações com o fato de que as surucucus na natureza são extremamente seletivas quando se trata de alimentação, preferindo mamíferos de pequeno porte e com massa relativa menor do que o esperado para uma espécie de serpente desse porte (MARTINS; OLIVEIRA, 1998; TURNER; CARMICHAEL; SOUZA, 2008), é bastante improvável que a frequência reprodutiva de fêmeas de surucucu seja anual na natureza. Sendo assim, consideramos que seja improvável que a frequência reprodutiva de fêmeas de *Lachesis muta* seja anual na natureza. Os principais fatores que podem influenciar esse padrão estão relacionados com o hábito alimentar, pois o animal demoraria mais tempo até atingir a quantidade energética suficiente; a duração da estação reprodutiva, em especial o comportamento de cuidado parental, que prolonga o período em que o animal permanece sem se alimentar; e a estrutura da população.

4.4 Variações Interpopulacionais

As características reprodutivas em serpentes Neotropicais são relativamente bem conservadas em algumas linhagens filogenéticas, como parece ser o caso dos crotalíneos (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014b). Entretanto, algumas diferenças na ecologia reprodutiva podem acontecer entre espécies relacionadas ou até populações (BELLINI; ARZAMENDIA; GIRAUDDO, 2019; PIZZATTO; JORDÃO; MARQUES, 2008). Fatores ambientais e climáticos variam em regiões diferentes e, portanto, podemos esperar que estratégias reprodutivas de uma mesma espécie apresentem diferenças de acordo com as áreas de distribuição das populações (SHINE 2003). Uma das características que frequentemente apresenta variação geográfica é o tamanho

do corpo, o qual influencia parâmetros reprodutivos importantes, como a fecundidade (FITCH, 1970, 1982; SHINE, 1993, 1994). Para a espécie *Bothrops leucurus* (BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014b), foi observada uma diferença significativa em relação ao tamanho da ninhada e ao tamanho do comprimento-rostro-cloacal de adultos que habitam duas regiões com diferentes regimes pluviométricos.

Solórzano e Cerdas (1989) estudaram duas populações de *Bothrops asper* da Costa Rica separadas por uma cadeia montanhosa: uma população (costa Pacífica) vive sob estações seca e chuvosa bem definidas e, a outra (costa Atlântica), sob alta pluviosidade o ano inteiro. Os autores encontraram diferenças no período de acasalamento e de nascimento dos filhotes. Outro estudo que remete às influências climáticas foi realizado com a serpente *Erythrolamprus miliaris* (PIZZATTO; MARQUES, 2006), entre populações da Bahia, nordeste brasileiro, e São Paulo e Paraná, sul e sudeste do Brasil. Os autores encontraram diferenças no ciclo reprodutivo das duas populações, sendo contínuo na população do nordeste brasileiro e sazonal na população do sul e sudeste, relacionado aos períodos mais quentes e chuvosos. Bellini et al. (2017) testaram pela primeira vez os efeitos ambientais e filogenéticos na biologia reprodutiva de Xenodontini sul-americanas a partir de método comparativo. As características reprodutivas estudadas sugerem ser altamente influenciadas pela ancestralidade nesse táxon, e fatores ambientais também demonstram influência apesar de em menor extensão, principalmente relacionados ao modo reprodutivo (ovíparo/vivíparo).

Os nossos resultados apontam diferenças em alguns eventos reprodutivos para as duas populações de *Lachesis muta* que ocupam o território brasileiro: ciclo espermatogênico, hipertrofia do SSR e época de nascimento dos filhotes. No caso do ciclo espermatogênico, nos machos da FA a espermatogênese tem início e pico entre novembro e abril (estação chuvosa), seguido da cópula, e quiescência em setembro e outubro (final da estação seca). Já os machos da MA, a espermatogênese coincide com a época de cópula (outono/inverno) e quiescência no verão. Machos de *Crotalus durissus* de regiões distintas também apresentaram diferenças no ciclo espermatogênico (BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012). As autoras relacionaram tais diferenças à plasticidade fenotípica da espécie em resposta a diferenças climáticas. No caso das surucucus, as duas regiões apresentam regimes pluviométricos alternados: cheias de novembro a abril na FA, e de abril a setembro na MA. Sendo assim, a diferença no ciclo espermatogênico entre machos de *L. muta* da população da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica pode ser um caso de plasticidade fenotípica em resposta a condições ambientais distintas (STEARNS, 1976), no caso o regime pluviométrico.

Para a hipertrofia do SSR, os nossos resultados indicam que machos da MA apresentam hipertrofia do SSR no outono e inverno (abril até setembro), enquanto nos machos da FA a hipertrofia do SSR coincide com a estação chuvosa (novembro a abril). Em ambas as populações, o ciclo do SSR acompanha o ciclo espermatogênico. Entretanto, uma análise histoquímica do SSR é necessária para uma melhor descrição do ciclo de hipertrofia do SSR para os machos de *L. muta* para que essas diferenças sejam confirmadas.

O período de nascimento dos filhotes da população da FA parece ser conservado em relação aos crotalíneos neotropicais, coincidindo com a época mais quente e úmida do ano. Entretanto, a população da MA indica certa plasticidade para esse caráter, uma vez que fêmeas prenhes e filhotes foram observados em mais de uma estação do ano.

As duas populações de *Lachesis muta* também demonstraram algumas características conservativas: época de vitelogênese, período da cópula, estratégia de estocagem de espermatozoides no oviduto e estocagem de espermatozoides no ducto deferente. No caso da vitelogênese, fêmeas das duas populações apresentaram vitelogênese ocorrendo nos mesmos meses, sob influência de condições climáticas distintas. Início no final do outono/início da estação seca com término na primavera/final da estação seca, coincidindo com a fertilização. Estocagem de espermatozoides foi observada no infundíbulo posterior e UMT em fêmeas da FA e MA ao longo desse mesmo período, indicando que a estratégia de *long-term sperm storage* (SCHUETT, 1992) pode ser obrigatória para essa espécie. Essa é uma característica conservada para os crotalíneos neotropicais e viperídeos de regiões temperadas (SCHUETT, 1992; ALDRIDGE; DUVALL, 2002; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002). Nossos dados contribuem para a hipótese de que a inércia filogenética seja atuante sobre o ciclo reprodutivo de fêmeas do grupo Viperidae (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012).

Para a época de cópula, os nossos resultados indicam, a partir dos dados de período de atividade dos machos, estocagem de espermatozoides no oviduto e período de vitelogênese, que a época de cópula coincide nas duas populações, de abril a agosto (outono e inverno – MA, início da estação seca – FA). Esses dados se contrapõem ao encontrado por Solórzano e Cerdas (1989) para *Bothrops asper*, onde foi verificada épocas de cópula distintas para as duas populações.

Machos das duas populações fazem estocagem no ducto deferente. Apesar da espermatogênese ter apresentado um caráter sazonal para as duas populações, o lúmen do ducto deferente esteve repleto de espermatozoides ao longo de todo o ano, com exceção de alguns machos da FA que apresentaram ducto com quantidade reduzida de espermatozoides

em alguns meses, mas nunca vazio. Essa característica pode indicar que machos dessa espécie são capazes de se reproduzir ao longo de todo o ano. Entretanto, estudos futuros devem considerar avaliar a viabilidade e qualidade do esperma em diferentes épocas do ano.

Em suma, tanto a plasticidade fenotípica quanto a inércia filogenética parecem moldar características da biologia reprodutiva das duas populações de *Lachesis muta* ao longo do Norte e do Nordeste brasileiro, e definir os limites de cada uma dessas influências pode ser uma tarefa difícil. Pesquisas futuras devem considerar incluir um maior número amostral de machos e fêmeas, investigações em campo para sanar as dúvidas sobre período de cópula e comportamentos reprodutivos, análises histoquímicas do SSR para quantificar a variação da atividade secretória desse órgão ao longo do ano, avaliação seminal e estudo da variação dos hormônios sexuais ao longo do ano.

A população da Floresta Amazônica parece apresentar estratégias reprodutivas mais conservadas em relação aos demais crotalíneos neotropicais do que a população da Mata Atlântica.

5 CONCLUSÃO

Estratégias reprodutivas das duas populações de *Lachesis muta* que ocorrem no Brasil apresentam tanto características conservadas em relação aos demais crotalíneos neotropicais (período de vitelogênese, período de cópula, estocagem de espermatozoides no oviduto e no ducto deferente) quanto plasticidade fenotípica (ciclo espermatogênico, ciclo do SSR, época de nascimento dos filhotes). Tal plasticidade pode ser resultado de respostas imediatas a diferenças climáticas.

A população da Floresta Amazônica apresenta estratégias reprodutivas mais conservadas do que a população da Mata Atlântica.

O ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de *L. muta* é sazonal para as duas populações, ao contrário do que foi sugerido pelos autores que estudaram a reprodução desse animal em cativeiro.

Fêmeas de *L. muta* provavelmente não se reproduzem anualmente e geram poucos filhotes por estação reprodutiva. Além disso, surucucus são espécies especialistas e de crescimento lento, que demoram para atingir a maturidade sexual. Tais características são preocupantes para a conservação dessa espécie na natureza. Sendo assim, esforços para a total compreensão da biologia reprodutiva dessa espécie e ações de educação ambiental com vista

na conservação devem ser prioritárias, uma vez que esse animal sofre com a perda exponencial de seu habitat natural e com a caça predatória.

REFERÊNCIAS

- ALDRIDGE, R. D. Environmental Control of Spermatogenesis in the Rattlesnake *Crotalus viridis*. **Copeia**, [s. l.], v. 1975, n. 3, p. 493, 1975.
- ALDRIDGE, R. D. Female Reproductive Cycles of the Snakes *Arizona elegans* and *Crotalus viridis*. **Herpetologica**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 256–261, 1979.
- ALDRIDGE, R. D. et al. Reproductive biology of the Massasauga (*Sistrurus catenatus*) from South-central Illinois. In: HAYES, W. K. et al. **Biology of the Rattlesnake**. Loma Linda: Loma Linda University Press, p. 403-412, 2008.
- ALDRIDGE, R. D.; BROWN, W. S. Male Reproductive Cycle, Age at Maturity, and Cost of Reproduction in the Timber Rattlesnake (*Crotalus horridus*). **Journal of Herpetology**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 399–407, 1995.
- ALDRIDGE, R. D.; DUVALL, D. Evolution of the Mating Season in the Pitvipers of North America. **Herpetological Monographs**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1, 2002.
- ALENCAR, L. R. V. et al. Diversification in vipers: Phylogenetic relationships, time of divergence and shifts in speciation rates. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s. l.], v. 105, p. 50–62, 2016. DOI 10.1016/j.ympev.2016.07.029 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2016.07.029>. Acesso em: 26 nov. 2018.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. 2005. 204p. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M. et al. Biologia reprodutiva de serpentes : recomendações para a coleta e análise de dados. **Herpetologia Brasileira**, [s. l.], v. 3, p. 14–24, 2014.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M. et al. Sperm storage in males of the snake *Crotalus durissus terrificus* (Crotalinae: Viperidae) in southeastern Brazil. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, [s. l.], v. 139, n. 2, p. 169–174, 2004.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M. et al. Reproductive Biology of the Brazilian Lancehead, *Bothrops moojeni* (Serpentes, Viperidae), from the State of São Paulo, Southeastern Brazil . **South American Journal of Herpetology**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 174–181, 2017.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ORSI, A. M. Ciclo Reprodutivo de *Crotalus Durissus* e *Bothrops jararaca*, morfologia e função do oviduto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 109–112, 2002.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G.. Long-Term Sperm Storage in the Female Neotropical Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). **Japanese journal of herpetology**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 46–52, 1997.
- ALMEIDA-SANTOS, S.M.; SALOMAO, M. G.; PENETI, E. A.; SENA, P. S.; GUIMARAES, E. S. Predatory Combat and tail wrestling in hierarchical contests of the

Neotropical Rattlesnakes *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes: Viperidae). **Amphibia-Reptilia**, [s.l.], v. 20, p. 88-96, 1999.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Reproduction in neotropical pitvipers with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G. W. **Biology of the Vipers**. [s.l.: s.n.], 2002. p. 445–462.

ALVES, F. Q.; ARGÔLO, A. J. S.; CARVALHO, G. C. Reproductive biology of the bushmaster *Lachesis muta* (Serpentes: Viperidae) in the Brazilian Atlantic Forest. **Phyllomedusa**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 99–109, 2014.

AMARAL, A. On the Oviparity of *Lachesis Muta* Daudin, 1803.” **Copeia**. [s.l.], n. 149, p. 93–94. Dec. 1925. DOI:10.2307/1435593. Disponível em: www.jstor.org/stable/1435593.

AMARAL, F. M. **Estratégias reprodutivas da serpente *Bothrops alternatus*: influência de fatores ambientais**. 2015. 131p. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

ANDRÉN, C. Courtship, mating and agonistic behaviour in a free-living population of adders, *Vipera berus* (L.). **Amphibia Reptilia**, [s. l.], v. 7, p. 353–383, 1986.

BARROS, V. A. **Biologia reprodutiva de três espécies de serpentes da Família Viperidae da região neotropical**. 2011. 88 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2011.

BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive Biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. **Advances in Zoology**, [s. l.], v. 2014, p. 1–11, 2014a.

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. **Herpetological Journal**, [s. l.], v. 24, n. April, p. 69–77, 2014b.

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. **Herpetological Journal**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 97–104, 2012.

BASSI, E. A.; COETI, R. Z.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive cycle and sperm storage of female coral snakes, *Micrurus corallinus* and *Micrurus frontalis*. **Amphibia Reptilia**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 13–27, 2020.

BELLINI, G. P.; ARZAMENDIA, V.; GIRAUDO, A. R. Is xenodontine snake reproduction shaped by ancestry, more than by ecology? **Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 263–271, 2017.

BELLINI, G. P.; ARZAMENDIA, V.; GIRAUDO, A. R. Reproductive life history of snakes in temperate regions: What are the differences between oviparous and viviparous species? **Amphibia Reptilia**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 291–303, 2019.

- BIRKHEAD, T. R.; MOLLER, 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**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 295–311, 1993.
- BISHOP, L. A.; FARRELL, T. M.; MAY, P. G. Sexual Dimorphism in a Florida Population of the Rattlesnake *Sistrurus miliarius*. **Herpetologica**, [s.l.], v. 52, n. 3, p. 360-364, 1996.
- BLEM, C. R. Biennial Reproduction in Snakes: An Alternative Hypothesis. **Copeia**, [s. l.], v. 1982, n. 4, p. 961, 1982.
- BONNET, X. et al. Sexual dimorphism in snakes: Different reproductive roles favour different body plans. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 265, n. 1392, p. 179–183, 1998.
- BONNET, X. et al. Reproductive versus ecological advantages to larger body size in female snakes, *Vipera aspis*. **Oikos**, [s. l.], v. 89, n. 3, p. 509–518, 2000.
- BONNET, X. et al. Reproduction in a typical capital breeder: Costs, currencies, and complications in the aspic viper. **Ecology**, [s. l.], v. 83, n. 8, p. 2124–2135, 2002.
- BOYER, D. M.; MITCHELL, L. A.; MURPHY, J. B. Reproduction and husbandry of the Bushmaster *Lachesis m. muta* at the Dallas Zoo. **International Zoo Yearbook**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 190–194, 1989.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. New York: Cornell University Press, 2004.
- CHACÓN, D.; VALVERDE, R. *Lachesis stenophrys* (Bushmaster) reproduction. **Herpetological Review**, [s. l.], p. 1, 2004.
- CORRALES, G. et al. Reproduction in captivity of the Central American bushmaster (*Lachesis stenophrys*, Serpentes: Viperidae), in Costa Rica. **Cuadernos de herpetología**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 137–139, 2014.
- CORRALES, G.; GÓMEZ, A.; FLORES, D. Reproduction of the South American Bushmaster, *Lachesis muta* (Serpentes: Viperidae), in Captivity. **Herpetological Review**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 608–611, 2016.
- COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis do brasil e suas unidades Federativas: lista de espécies. **Revista Herpetologia Brasileira**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 11–57, 2018.
- COUTO, M. **E se Obama fosse africano?: e outras intervenções**. São Paulo: Companhia das Letras, 208p. 2011.
- DE SOUZA, R. C. G. Reproduction of the Atlantic Bushmaster (*Lachesis muta rhombeata*) for the First Time in Captivity. **Bull. Chicago Herp. Soc.**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 41–43, 2007.
- EISELE, B. R. Propagation of the South American bushmaster (*Lachesis muta muta*) at the Jacksonville Zoo and Gardens. **IRCF.**, [s.l.], v.16, n.3, p.182–189, 2009.
- FARNER, D. S. Generation and Regulation of Annual Cycles in Migratory Passerine Birds. **American Zoologist**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 493–501, 1986.

- FENWICK, A. M.; GREENE, H. W.; PARKINSON, C. L. The serpent and the egg: Unidirectional evolution of reproductive mode in vipers? **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 59–66, 2012.
- FERNANDES, D.; FRANCO, F.; FERNANDES, R. Systematic Revision of the Genus *Lachesis*. **Herpetologica**, [s. l.], v. 60(2), n. June, p. 245–260, 2004.
- FITCH, H. S. **Reproductive Cycles in Lizards and Snakes**. Lawrence: Museum of Natural History, University of Kansas, 1970. 247p.
- FITCH, H. S. Reproductive cycles in tropical reptiles. **Occasional Papers of the Museum of Natural History, University of Kansas**, Lawrence, v. 96, p. 1-53, 1982.
- FORD, N. B.; SEIGEL, R. A. Relationships among body size, clutch size and egg size in three species of oviparous snakes. **Herpetologica**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 75–83, 1989.
- FOX, W. Seminal receptacles of snakes. **The Anatomical Record**, [s. l.], v. 124, n. 3, p. 519–539, 1956.
- FRIESEN, C. R. et al. Not just a chastity belt: The functional significance of mating plugs in garter snakes, revisited. **Biological Journal of the Linnean Society**, [s. l.], v. 109, n. 4, p. 893–907, 2013.
- FUENTES, R.; CORRALES, G. New distribution record and reproductive data for the Chocoan Bushmaster, *Lachesis acrochorda* (Serpentes: Viperidae), in Panama. **Mesoamerican Herpetology**, [s. l.], v. 115, n. 1, p. 114–127, 2016.
- GOLDBERG, S. R.; PARKER, W. S. Seasonal Testicular Histology of the Colubrid Snakes, *Masticophis taeniatus* and *Pituophis melanoleucus*. **Herpetologica**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 317–322, 1975.
- GREENE, H. W. **Snakes: the evolution of mystery in nature**. [s.l.]: University of California Press, 1997. 351p.
- GREENE, H. W.; SANTANA, M. A. Field studies of hunting behavior by bushmasters. Estudios de campo del comportamiento de caza por parte de las cascabelas mudas. **American Zoologist**, v. 23, p. 897, 1983.
- GRIFFITH, O. W. et al. Ancestral state reconstructions require biological evidence to test evolutionary hypotheses: A case study examining the evolution of reproductive mode in squamate reptiles. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, [s. l.], v. 324, n. 6, p. 493–503, 2015.
- HARTMANN, M. T.; MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of the southern Brazilian pitviper *Bothrops neuwiedi pubescens* (Serpentes, Viperidae). **Amphibia Reptilia**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 77–85, 2004.
- HENAO, A. M. D.; CORRALES, G. First report of the reproduction in captivity of the Chocoan Bushmaster, *Lachesis acrochorda* (García, 1896). **Herpetology Notes**, [s. l.], v. 8, n. 52, p. 315–320, 2015.
- INEICH, I. et al. What, if anything, is a “typical” viper? Biological attributes of basal viperid

snakes (genus *Causus* Wagler, 1830). **Biological Journal of the Linnean Society**, [s. l.], v. 89, n. 4, p. 575–588, 2006.

IVERSON, J. B. Patterns of relative fecundity in snakes. **Florida Scientist**, [s.l.], v.50, n.4, p.223-233, 1987. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/24320178>.

JOHNSON, L. F.; JACOB, J. S.; TORRANCE, P. Annual Testicular and Androgenic Cycles of the Cottonmouth (*Agkistrodon piscivorus*) in Alabama. **Herpetologica**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 16–25, 1982.

KASPEROVICZUS, K. N. **Evolução das estratégias reprodutivas de *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. 2013. 134p. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

KING, R. Body Size Variation among Island and Mainland Snake Populations. **Herpetologica**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 84–88, 1989.

LEÃO, S. M. et al. Natural History of *Bothrops itapetiningae* Boulenger, 1907 (Serpentes: Viperidae: Crotalinae), an Endemic Species of the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 324–331, 2014.

MANN, T. **Spermatophores**: development, structure, biochemical attributes, and role in the transfer of spermatozoa. [s.l.]: Springer-Verlag, 1984. 217p.

MARQUES, O. A. V. Biologia reprodutiva da cobra-coral *Erythrolamprus aesculapii* Linnaeus (Colubridae), no Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 747–753, 1996.

MARQUES, O. A. V.; KASPEROVICZUS, K.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive Ecology of the Threatened Pitviper *Bothrops insularis* from Queimada Grande Island, Southeast Brazil. **Journal of Herpetology**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 393–399, 2013.

MARTINS, M.; OLIVEIRA, M. E. Natural History of Snakes in Forests of the Manaus Region, Central Amazonia, Brazil. **Herpetological Natural History**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 78–150, 1998.

MATHIES, T. Reproductive Cycles of Tropical Snakes. In: ALDRIDGE, R.; SEVER, D. M. (ed.) **Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes**. [s.l.]: CRC Press, 2011, cap.12, p. 511–550.

MELGAREJO, A. R. ; CUNHA, A. C. M. ; AGUIAR, A. S. . Reprodução de *Lachesis muta rhombeata* WIED, 1824 (SERPENTES: VIPERIDAE). In: V Congresso Latinoamericano de Herpetologia, 1999, Montevideú. **Resumos [...]**. Montevideú, 1999.

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

MOLE, R. R. 11. The Trinidad Snakes. **Proceedings of the Zoological Society of London**. Oxford, v. 94, n.1, p. 235-278, 1924.

MONTEIRO, C. et al. Feeding, Reproduction, and Morphology of *Bothrops matogrossensis*

- (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) in the Brazilian Pantanal. **Journal of Herpetology**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 408–413, 2006.
- MUNIZ-DA-SILVA, D. F. et al. Caudal oviduct coiling in a viperid snake, *Crotalus durissus*. **Acta Zoologica**, [s. l.], n. July, p. 1–9, 2018.
- NOGUEIRA, C.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 653–659, 2003.
- NUNES, S. F. et al. Reproductive and feeding biology of the pitviper *Rhinocerophis alternatus* from subtropical Brazil. **The Herpetological Journal**, v. 20, n. 1, p. 31–39, 2010.
- PEARSON, D.; SHINE, R.; HOW, R. Sex-specific niche partitioning and sexual size dimorphism in Australian pythons (*Morelia spilota imbricata*). **Biological Journal of the Linnean Society**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 113–125, 2002.
- PERRINS, C. M. The timing of Birds' Breeding Seasons. **Ibis**, [s. l.], v. 112, n. 2, p. 242–255, 1970.
- PERRINS, C. M.; BIRKHEAD, T. R. **Avian Ecology**. [s.l.]: Blackie, 1983. 221p.
- PINTO, R. R.; FERNANDES, R. Reproductive biology and diet of *Liophis poecilogyrus poecilogyrus* (Serpentes, Colubridae) from southeastern Brazil. **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 9, 2013.
- PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; MARQUES, O. A. Herpetologia no Brasil II Biologia reprodutiva de serpentes brasileiras Herpetologia no Brasil. **Herpetologia No Brasil**, [s. l.], p. 201–221, 2006.
- 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**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 153–162, 2008.
- PIZZATTO, L.; MARQUES, O. A. V. Reproductive biology of the false coral snake *Oxyrhopus guibeii* (Colubridae) from southeastern Brazil. **Amphibia Reptilia**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 495–504, 2002.
- RIPA, D. The reproduction of the Central American Bushmaster (*Lachesis mutastenophrys*) and the Blackheaded Bushmaster (*Lachesis mutamelanocephala*) for the first time in captivity. **Bulletin of the Chicago Herpetological Society**, v. 29, p. 165–183, 1994.
- RIPA, D. Keys to understanding the bushmasters (genus *Lachesis* Daudin, 1803). **Bulletin of the Chicago Herpetological Society**, v. 34, n. 3, p. 45–92, 1999.
- RIPA, D. **The Bushmasters: Morphology in evolution and behavior**. [s.l: s.n.]. v. 2. 2002.
- ROCHA, M. C. et al. Seasonal, daily activity, and habitat use by three sympatric pit vipers (Serpentes, Viperidae) from southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 695–705, 2014.

SAINT-GIRONS, H. Reproductive Cycles of Male Snakes and Their Relationships with Climate and Female Reproductive Cycles. **Herpetologica**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 5–16, 1982.

SALOMÃO, M. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. The reproductive cycle in male neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). In: SCHUETT, G. W. et al. (ed.).

Biology of the Vipers. Eagle Mountain: Eagle Mountain Publishing, 2002. p. 507-514.

SASA, M.; WASKO, D. K.; LAMAR, W. W. Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. **Toxicon**, [s. l.], v. 54, n. 7, p. 904–922, 2009.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.024>. Acesso em: 30 jan. 2020.

SAZIMA, I. Natural History of The Jararaca Pitviper, *Bothrops jararaca*, in Southeastern Brazil. **Biology of the Pitvipers**, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 18, 1992.

SCHUETT, G. W. Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers? In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE, E. D. **Biology of the Pitvipers**. Tyler: Selva, 1992. p. 169–184.

SCHUETT, G. W. Fighting dynamics of male copperheads, *Agkistrodon contortrix* (Serpentes, Viperidae): Stress-induced inhibition of sexual behavior in losers. **Zoo Biology**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 209–221, 1996.

SCHUETT, G. W. Body size and agonistic experience affect dominance and mating success in male copperheads. **Animal Behaviour**, [s. l.], v. 54, p. 213–224, 1997.

SEIGEL, R. A.; FORD, N. B. Reproductive Ecology. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S. (ed.). **Snakes: Ecology and Evolutionary Biology**. New York: MacMillan Publishing Company, 1987.

SEIGEL, R. A.; HUGGINS, M. M.; FORD, N. B. Reduction in locomotor ability as a cost of reproduction in gravid snakes. **Oecologia**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 481–485, 1987.

SHINE, R. Reproduction in Australian Elapid Snakes II. Female Reproductive Cycles. **Aust. J. Zool.**, [s. l.], v. 25, p. 655–666, 1977a.

SHINE, R. Reproduction in Australian Elapid Snakes I. Testicular Cycles and Mating Seasons. **Aust. J. Zool.**, [s. l.], v. 25, p. 647–653, 1977b.

SHINE, R. Sexual size dimorphism and male combat in snakes. **Oecologia**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 269–277, 1978.

SHINE, R. “Costs” of Reproduction in Reptiles. **Oecologia**, [s. l.], v. 46, n. 1980, p. 92–100, 1980.

SHINE, R. Sexual dimorphism in snakes. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T. (ed.). **Snakes: Ecology and behaviour**. New York: McGraw-Hill and Co, 1993. p. 49-86

SHINE, R. Sexual Size Dimorphism in Snakes Revisited. **Copeia**, [s. l.], v. 2, p. 326–346, 1994.

SHINE, R. Reproductive strategies in snakes. **Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences**, [s. l.], v. 270, n. 1519, p. 995–1004, 2003.

- SHINE, R. Evolution of an Evolutionary Hypothesis: A History of Changing Ideas about the Adaptive Significance of Viviparity in Reptiles. **Journal of Herpetology**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 147–161, 2014.
- SHINE, R. et al. Reproductive biology and food habits of horned adders, *Bitis caudalis* (Viperidae), from southern Africa. **Copeia**, [s.l.], v. 1998, n.2, p. 391-401, 1998.
- SHINE, R.; BONNET, X. Reproductive biology, population viability, and options for field management. In: MULLIN, S. J.; SEIGEL, R. A. (ed.). **Snakes – ecology and conservation**. Ithaca: Cornell University Press, 2009. p. 172-200
- SHINE, R.; THOMPSON, M. B. Did Embryonic Responses To Incubation Conditions Drive the Evolution of Reproductive Modes in Squamate Reptiles? **Herpetological Monographs**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 159, 2006.
- SIEGEL, D. S.; SEVER, D. M. Sperm Aggregations in Female *Agkistrodon piscivorus* (Reptilia: Squamata): A Histological and Ultrastructural Investigation. **Journal of Morphology**, [s. l.], v. 269, n. October, p. 189–206, 2008.
- SILVA, K. M. P. **Biologia reprodutiva da jararaca da Amazônia**, *Bothrops atrox* (Serpente: Viperidae). 2015. 81p. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- SILVA, K. M. P. et al. Reproductive Biology of *Bothrops atrox* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) from the Brazilian Amazon. **Herpetologica**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 198, 2019a.
- SILVA, K. M. P. et al. Infundibular sperm storage and uterine muscular twisting in the Amazonian lancehead, *Bothrops atrox*. **Anatomical Record**, [s. l.], n. March, p. 1–10, 2019b.
- SOLÓRZANO, A. **Serpientes de Costa Rica: distribución, taxonomía e historia natural**. Santo Domingo: Editorial INBio, 2004.
- SOLÓRZANO, A.; CERDAS, L. A. New Subspecies of the Bushmaster, *Lachesis muta*, from Southeastern Costa Rica. **Journal of Herpetology**. Vol. 20, No. 3 (Sep., 1986), p. 463-466.
- SOLÓRZANO, A.; CERDAS, L. Biología Reproductiva de la cascabel centroamericana *Crotalus durissus durissus* (Serpentes: Viperidae) en Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, [s. l.], v. 36, n. 2A, p. 221–226, 1988.
- SOLÓRZANO, A.; CERDAS, L. Reproductive biology and distribution of the terciopelo, *Bothrops asper* Garman (Serpentes: Viperidae), in Costa Rica. **Herpetologica**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 444–450, 1989.
- STEARNS, S. C. Life-History Tactics: A Review of the Ideas. **The Quarterly Review of Biology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 3–47, 1976.
- STEARNS, S. C. Trade-offs in life-history evolution. **Functional Ecology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 259–268, 1989.
- STEARNS, S. C.; KOELLA, J. C. The Evolution of Phenotypic Plasticity in Life-History Traits: Predictions of Reaction Norms For Age and Size at Maturity. **Evolution**, [s. l.], v. 40,

n. 5, p. 893–913, 1986.

SUEIRO, L. R. **Custos reprodutivos em *Crotalus durissus* do estado de São Paulo**. 2013. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-06062013-114615/pt-br.php>. Acesso em: 13 set. 2019.

TURNER, E.; CARMICHAEL, R.; SOUZA, R. Dialogues on the Tao of Lachesis. **Bull. Chicago Herp. Soc.**, [s. l.], v. 43, n. 10, p. 157–164, 2008. Disponível em: http://www.lachesisbrasil.com.br/download/BulChicagoHerpSoc_Vol43Num10pp157-164%282008%29.pdf. Acesso em: 13 ago. 2019.

UETZ, P.; HOŠEK, J. **The Reptile Database**. 2014. Disponível em: <http://www.reptile-database.org/>. Acesso em: 27 mar. 2018. Base de Dados.

VALDUJO, P. H.; NOGUEIRA, C.; MARTINS, M. Ecology of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 169, 2002.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, 1996. 196p

VIAL, J. L.; JIMENEZ-PORRAS, J.M. The Ecogeography of the Bushmaster, *Lachesis muta*, in Central America. **American Midland Naturalist**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 182, 1967.

VOLSØE, H. Structure and seasonal variation of the male reproductive organs of *Vipera berus* (L.). **Spolia Zoologica Musei Hauniensis**, [s.l.], v. 5, p. 1-157, 1944.

WEIL, M. R.; ALDRIDGE, R. D. The effect of temperature on the male reproductive system of the common water snake *Nerodia sipedon*. **Journal of Experimental Zoology**, [s. l.], v. 210, n. 2, p. 327–332, 1979.

WILSON, F. E.; DONHAM, R. S. Daylength and control of seasonal reproduction in male birds. In: STETSON, M. H. (ed.). **Processing of environmental information in vertebrates**. New York: Springer, 1988. cap.6, p. 101-119.

WINGFIELD, J. C. Fine temporal adjustments of reproductive function. In: EPPLÉ, A.; STETSON, M. H. (ed). **Avian Endocrinology**. New York: Academic Press, 1980. p. 367-389.

WINGFIELD, J. C. Environmental and endocrine control of avian reproduction: an ecological approach. In: MIKAMI, S.; HOMMA, K.; WADA, M. (ed.). **Avian endocrinology**. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1983. p.265-288.

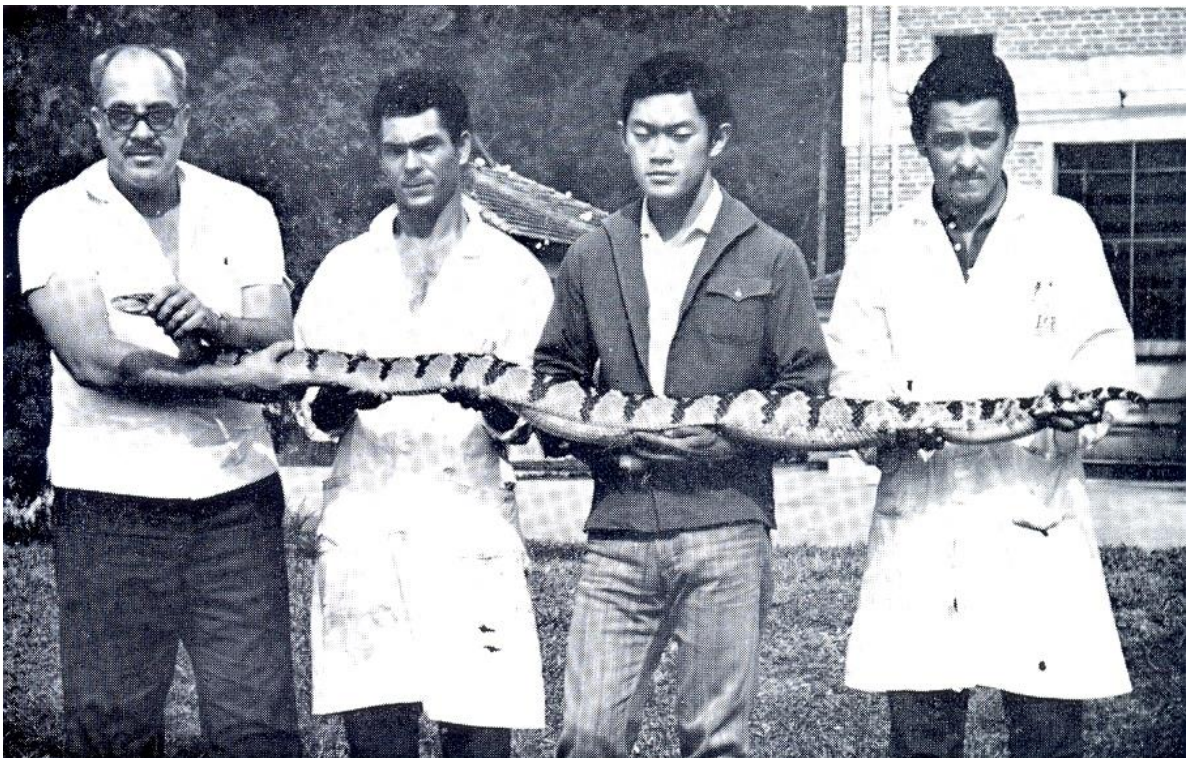
ZAMUDIO, K. R.; GREENE, H. W. Filogeografia do (*Lachesis muta*: Viperidae): implicações para a biogeografia bushmaster neotropical, sistemática e conservação. **Biological Journal of the Linnean Society**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 421–442, 1997. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1095-8312.1997.tb01634.x>. Acesso em: 20 fev. 2020.

ZAR, J. H. **Biostatística analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 663 p.

CAPÍTULO 2: Estocagem de espermatozoides e aspectos morfológicos do oviduto de *Lachesis muta* (Serpentes: Viperidae).

“Embora raramente vista por naturalistas, essa grande cobra inspirou mais de cinquenta nomes populares na América Latina. Alguns brasileiros dizem que a Surucucu apaga incêndios, outros dizem que sugam o leite de vacas e mulheres adormecidas. A imagem dessa serpente nos relatos de viajantes é envolta por fantasias. Até pouco tempo, poucos herpetólogos haviam encontrado com a surucucu de fato, e sabíamos pouco mais do que Ditmars havia relatado: elas são enormes, são raras, supostamente ferozes e põem ovos, um hábito único entre as víboras do Novo Mundo.”

Greene 1997 – Snakes: the Evolution of mystery in nature.



Lachesis muta. Foto: Kazuo Koba, 1967.

1 INTRODUÇÃO

A grande complexidade e diversidade dos órgãos reprodutivos de Squamata instigam a busca por possíveis funções morfológicas dessas estruturas, as quais podem ser co-responsáveis pela garantia do sucesso reprodutivo das espécies (GIRLING, 2002; ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2015). Como reflexo desta complexidade estrutural, diferentes propostas de nomenclatura e função para cada região do oviduto das fêmeas de Squamata têm sido discutidas (ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2019). Atualmente, o oviduto das serpentes é dividido em infundíbulo anterior e posterior, útero glandular, útero aglandular e vagina (BLACKBURN, 1998; ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2015; SEVER; HAMLETT, 2002; SIEGEL; SEVER, 2006; SIEGEL et al., 2011; SILVA et al., 2019a).

Devido ao fato de existirem dois modos reprodutivos distintos em Squamata, ovíparo e vivíparo, observam-se variações na morfologia e função do oviduto entre diferentes espécies que estão relacionadas à formação da casca do ovo, já que as estruturas responsáveis pela produção da casca ocorrem em quantidades diferentes nos dois grupos de espécies (GIRLING, 2002). Nas espécies ovíparas, a região do útero glandular é constituída por grande quantidade de glândulas mucosas, as quais são menos evidentes nas espécies vivíparas. Sua função é associada à produção da casca do ovo e, ao longo do ciclo reprodutivo, é possível observar mudanças morfo-estruturais nessa região, como aumento da altura e da atividade secretória do tecido epitelial (GIRLING, 2002; PERKINS; PALMER, 1996; ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2015; BRAZ et al., 2018)

Outro aspecto intrigante a respeito do oviduto de Squamata é a observação recorrente da capacidade de estocagem de espermatozoide (HOLT; FAZELI, 2016). Nas serpentes, a estocagem pode ocorrer em duas regiões: no infundíbulo posterior, em regiões especializadas chamadas de receptáculos seminais; e no útero aglandular, onde o esperma é alojado em criptas ou glândulas (ALMEIDA-SANTOS et al., 2017; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; FOX, 1956; LUDWIG; RAHN, 1943). Esta estratégia ocorre quando o período de cópula é dissociado do período de ovulação nas fêmeas e, assim, a estocagem garantiria o episódio da fertilização (SHUETT, 1992). São descritas duas estratégias de estocagem de espermatozoides para serpentes: *short-term storage*, ou estocagem de curto prazo, quando os espermatozoides são estocados em regiões do infundíbulo posterior até a

ovulação; ou *long-term storage*, ou estocagem de longa duração, quando o espermatozoide é estocado primeiro no útero aglandular e depois, próximo à época de ovulação, ascende até a região do infundíbulo (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; HALPERT; GARSTKA; CREWS, 1982; SCHUETT, 1992; SIEGEL et al., 2011).

Para que seja possível o fenômeno da estocagem de espermatozoide, o oviduto deve apresentar estruturas físicas e/ou mecanismos químicos que garantam a sobrevivência dos espermatozoides durante o período necessário (FOX, 1956; HALPERT; GARSTKA; CREWS, 1982; MARINHO et al., 2009; SEVER; RYAN, 1999; SEVER; HAMLETT, 2002). No caso do infundíbulo posterior, glândulas tubulares ou alveolares e células ciliadas garantem comunicação e movimentação entre o lúmen e os receptáculos de sêmen (FORD; SEIGEL, 2011; FOX, 1956). Já no útero aglandular, em especial para a família Viperidae, a estocagem ocorre por meio da formação da UMT (*Uterine Muscular Twisting*) (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002). A UMT consiste em uma alteração morfológica na camada muscular circular e na mucosa que, quando contraídas, assumem um padrão espiral (MUNIZ-DA-SILVA et al., 2018). Os espermatozoides, então, ficam retidos nas dobras que são formadas pela espiral (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012).

Tanto a estocagem quanto a presença da UMT, é observada frequentemente na família Viperidae e é descrita para muitas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; ALMEIDA-SANTOS et al., 2017; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2014a; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; SILVA et al., 2019b). Para a espécie *Lachesis muta* (surucucu), e inclusive para o gênero *Lachesis* como um todo, não existe nenhum relato na literatura que comprove ou não a formação do UMT na região da junção útero-vaginal, assim como a ocorrência ou não de estocagem de espermatozoide em alguma região do oviduto.

A espécie *Lachesis muta*, conhecida popularmente como surucucu ou surucucu-pico-de-jaca, é o maior viperídeo do continente americano e sua distribuição é restrita às florestas tropicais e úmidas da América do Sul: os biomas da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica brasileira (VIAL; JIMENEZ-PORRAS, 1967; CAMPBELL; LAMAR, 2004). É um grupo extremamente interessante e filogeneticamente complexo (FENWICK; GREENE; PARKINSON, 2012), que apresenta a oviparidade como modo reprodutivo, ao contrário dos demais crotalíneos neotropicais (AMARAL, 1925; CAMPBELL; LAMAR, 2004). Informações sobre a biologia reprodutiva desta espécie estão restritas a acompanhamentos em

cativeiro, sem análise histológica e anatômica do trato reprodutivo dos animais (RIPA, 1999, 2004; MELGAREJO et al., 1999; DE SOUZA, 2007; CORRALES, 2016). O único trabalho realizado com avaliação histológica (ALVES; ARGÔLO; CARVALHO, 2014) não foi conclusivo para a estratégia de estocagem de espermatozoides pois não avaliou o infundíbulo posterior ou a região da UMT. Além disso, este trabalho apresenta equívocos em relação ao ciclo reprodutivo feminino, como classificação errônea entre fêmeas prenhes e em vitelogênese secundária (Eletra de Souza, obs. pess.), o que impossibilita a interpretação dos resultados.

Sendo assim, aspectos de estrutura e morfologia do oviduto da surucucu permanecem sem esclarecimento e levantam questões acerca da existência ou não da estocagem de espermatozoides. O presente trabalho teve como objetivo investigar a estrutura e a morfologia do oviduto das fêmeas de *Lachesis muta* ao longo das etapas de vitelogênese primária e secundária do ciclo reprodutivo, a fim de confirmar a hipótese de que essa espécie apresenta a estratégia de estocagem de espermatozoides, assim como a presença do *Uterine Muscular Twisting* (UMT) na região da junção útero-vaginal. Com nossos resultados, buscamos contribuir na detecção de um padrão nas estratégias reprodutivas de fêmeas da família Viperidae.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Os animais

Foram examinados 47 exemplares de fêmeas de *Lachesis muta* da região da Floresta Amazônica brasileira (FA) e da Mata Atlântica (MA), dos Estados de Pernambuco, Bahia, Alagoas, Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso, Pará, Roraima, Rondônia, Acre e Amazonas. Os indivíduos analisados eram procedentes das seguintes coleções herpetológicas e instituições: Coleção Herpetológica Alphonse Hoge do Instituto Butantan (IBUSP), Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) e Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (MZUESC).

Do total de indivíduos avaliados, 27 fêmeas estavam em vitelogênese primária, V1, (foliculos < 15 mm), 12 em vitelogênese secundária, V2, e três fêmeas prenhes. Não foi possível verificar o estágio reprodutivo em cinco indivíduos.

2.2 Coleta de dados

Para todos os espécimes foram coletados o comprimento rostro-cloacal (CRC), o diâmetro do maior folículo ovariano (paquímetro digital 0,1 mm), e visualmente registrada a presença ou ausência da *Uterine Muscular Twisting* (UMT). As fêmeas foram consideradas maduras quando apresentavam folículos em vitelogênese secundária (> 15 mm), ou a presença de ovos no oviduto, ou útero escuro, alargado e com presença de dobras, ou pela presença do UMT, ou a partir da observação de espermatozoides no oviduto em análise histológica.

Para verificar a ocorrência de estocagem de espermatozoides e a variação das estruturas morfológicas do oviduto ao longo das diferentes fases do ciclo reprodutivo, fragmentos de tecido histológico foram coletados de 2 fêmeas prenhes, 20 fêmeas em V1 e 12 fêmeas em V2. As amostras coletadas correspondem a aproximadamente 10 mm do infundíbulo posterior, do útero aglandular, do útero glandular e da vagina. Todos os fragmentos histológicos foram mantidos em etanol 70% até serem submetidos a protocolo padrão de inclusão em parafina.

2.3 Microscopia de luz

As amostras foram processadas em protocolo padrão de inclusão em parafina: série crescente de desidratação em etanol 70%, 80%, 90% e 100%, seguido de diafanização em Xilol fracionado e Xilol puro. Após, foram submersos em parafina na estufa à 60°C durante 24 horas e depois impregnados definitivamente com parafina e cera de abelha em proporção 1:1. Os cortes foram feitos em micrótomo na espessura de 5 µm. A coloração histológica padrão utilizada foi hematoxilina e eosina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008)

Para determinar possíveis variações na atividade secretória do oviduto durante as fases do ciclo reprodutivo, as amostras também foram submetidas às seguintes reações histoquímicas: ácido periódico de Schiff (PAS) para identificação de carboidratos neutros, alcian blue (AB) pH 2.5 para identificação de glicosaminoglicanos carboxilados, e bromofenol blue (BB) para identificação de proteínas.

Fotografias foram feitas no Microscópio Olympus BX 51, acoplado a câmera digital Olympus DP73 no laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

2.4 Microscopia eletrônica de varredura

Para realizar a microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram lavadas e desidratadas em uma série crescente de etanol. Então, os tecidos foram secos pelo método do ponto crítico usando dióxido de carbono como fluido de transição. Após, o material foi montado em stubs usando fita adesiva dupla face e borrifados com ouro de acordo com metodologia em (MUNIZ-DA-SILVA et al., 2018). As imagens foram analisadas e capturadas em uma máquina FEI Quanta 250 no Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

2.5 Análise de dados

Para verificar a variação nas estruturas histológicas e atividade secretória ao longo do ciclo reprodutivo, foram tiradas medidas microscópicas em 15 fêmeas em V1 e 11 fêmeas em V2. As medidas feitas foram: altura do epitélio do infundíbulo posterior, altura do epitélio da vagina, altura do epitélio do útero glandular e diâmetro das glândulas mucosas do útero glandular. Para cada estrutura, cada medida foi replicada cinco vezes a fim de obter a média. As medições foram feitas utilizando o software de imagem cellSens, em aumento 20x.

Os dados foram analisados de acordo com Zar (1999), utilizando-se teste paramétrico ou o equivalente não paramétrico dependendo da normalidade e homogeneidade das amostras. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Para o comprimento do epitélio do infundíbulo posterior, utilizamos o teste de Mann Whitney Wilcox, e para o restante foi utilizado o teste t de Student. A variável dependente foi o ciclo reprodutivo, ou seja, V1 ou V2. Os testes estatísticos foram feitos no software R.

3 RESULTADOS

3.1 Uterine Muscular Twisting (UMT)

Pela primeira vez foi observado a formação da contração muscular uterina na região do útero aglandular, a UMT, para o grupo *Lachesis*. A UMT foi observada em 15 fêmeas avaliadas, sendo uma prenhe, seis em vitelogênese secundária (V2), sete em vitelogênese primária (V1), e duas em estágio indeterminado (Tabela 2.1). Foram encontrados

espermatozoides estocados na UMT de uma fêmea prenhe e de duas fêmeas em V2, e no infundíbulo posterior de uma fêmea em V1 e uma fêmea em V2.

Tabela 2.1 – Espécimes examinados de *Lachesis muta*. (T/C = número de tombo/ coleção; CRC = comprimento rostro-cloacal; E. R. = estágio reprodutivo – P = prenhe, V1 = vitelogênese primária, V2 = vitelogênese secundária; UMT = uterine muscular twisting, sim – presente, não – ausente; Região = habitat, FA – Amazônia, MA – Mata Atlântica; Sptz = presença de espermatozoides, UMT: uterine muscular twisting; IP: infundíbulo posterior).

T/C	CRC (mm)	Mês	E. R.	UMT	Região	Sptz
45997/IBU	1830	Agosto	P	Sim	FA	UMT
8697/IBU	1420	Julho	V1	Sim	MA	
1154/IBU	1600	Fevereiro	V1	Não	MA	
9308/IBU	1620	Junho	V1	Não	MA	
9320/IBU	1960	Junho	V1	Não	MA	
17957/IBU	1630	Novembro	V1	Não	MA	
55361/IBU	1780	Novembro	V1	Não	FA	
11282/MZUSP	1730	Abril	V1	Não	FA	
9415/MZUSP	1800	Janeiro	V1	Não	FA	
9416/MZUSP	1930	Fevereiro	V1	Não	FA	
9261/MZUSP	1790	Setembro	V2	Sim	FA	
4261/MZUSP	1650	Fevereiro	V1	Sim	FA	
11188/MZUSP	1840	Outubro	V1	Não	FA	
11184/MZUSP	2005	Fevereiro	V1	Sim	FA	
19666/MZUSP	1500	Setembro	V1	Não	FA	
17760/MPEG	1710	Março	-	Sim	FA	
19122/MPEG	1970	Março	V1	Sim	FA	IP
16514/MPEG	1830	Maiο	V2	Sim	FA	UMT
22007/MPEG	1750	Março	V1	Não	FA	
19890/MPEG	1770	Janeiro	V1	Não	FA	
20710/MPEG	2030	Julho	V2	Não	FA	
21683/MPEG	1680	Abril	V1	Não	FA	
21684/MPEG	1830	Maiο	V2	Não	FA	IP

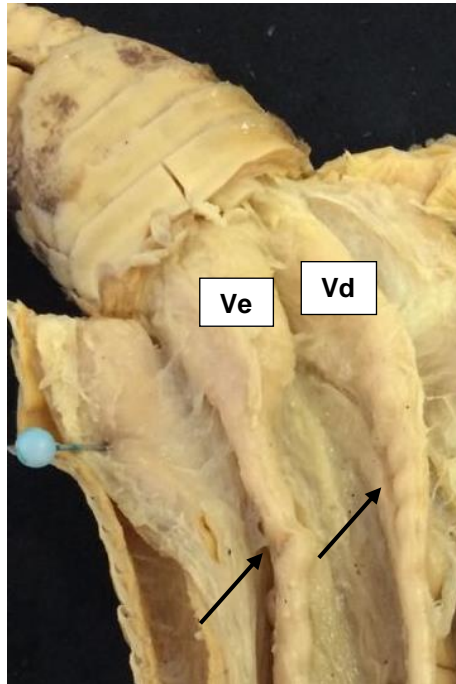
314/MZUESC	1716	Setembro	V1	Não	MA	
710/MZUESC	1637	Janeiro	V1	Não	MA	
1079/MZUESC	1575	Dezembro	V1	Sim	MA	
1081/MZUESC	1441	Julho	-	Não	MA	
1528/MZUESC	1852	Maio	V1	Não	MA	
1404/MZUESC	1575	Novembro	V1	Não	MA	
1407/MZUESC	1545	Março	V1	Não	MA	
2085/MZUESC	2070	Agosto	V2	Sim	MA	
2913/MZUESC	1850	Março	V1	Sim	MA	
2965/MZUESC	1690	Abril	V1	Sim	MA	
3013/MZUESC	1435	Abril	V1	Não	MA	
3014/MZUESC	1444	Abril	V2	Não	MA	
3123/MZUESC	2200	Agosto	V2	Sim	MA	
5029/MZUESC	1912	Janeiro	-	Sim	MA	
5359/MZUESC	1806	Junho	V2	Não	MA	
5442/MZUESC	1749	Maio	V2	Não	MA	
6603/MZUESC	1626	Março	V1	Não	MA	
7354/MZUESC	1686	Junho	V2	Sim	MA	
7430/MZUESC	1570	Julho	V2	Sim	MA	
7803/MZUESC	1909	Setembro	P	Não	MA	
8041/MZUESC	1901	Outubro	-	Não	MA	
8538/MZUESC	1790	Março	P	Não	MA	
9313/MZUESC	1565	Setembro	V2	Não	MA	UMT
3031/MZUESC	1837	Maio	-	Não	MA	

Fonte: SOUZA, E. 2020

3.1.1 Aspecto morfológico da UMT

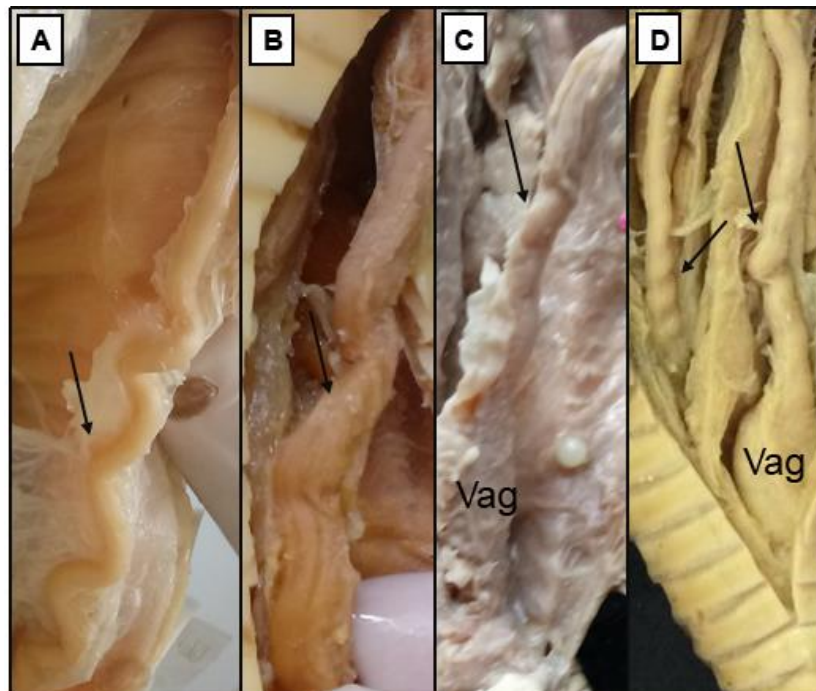
Macroscopicamente, a UMT consiste em uma modificação de formato espiralado na região imediatamente anterior à vagina (Figura 2.1 e 2.2 D). Essa alteração era percebida com facilidade na maioria dos indivíduos, mas, às vezes, era necessário retirar uma camada superficial da serosa para melhor visualização (Figura 2.2 A, B e C).

Figura 2.1 – Aspecto geral da UMT de *Lachesis muta*. Ve = vagina esquerda; Vd = vagina direita; setas apontam a região do útero aglandular onde está formado o fenômeno do UMT.



Fonte: SOUZA, E. 2020

Figura 2.2 – Tipos morfológicos do UMT encontrados em fêmeas diferentes de *Lachesis muta*. A), B) e C) Além do formato em espiral, a região também forma um “zigue-zague”. D) Formato em espiral. Vag= vagina; setas apontam a região do útero aglandular onde está formado o fenômeno do UMT.

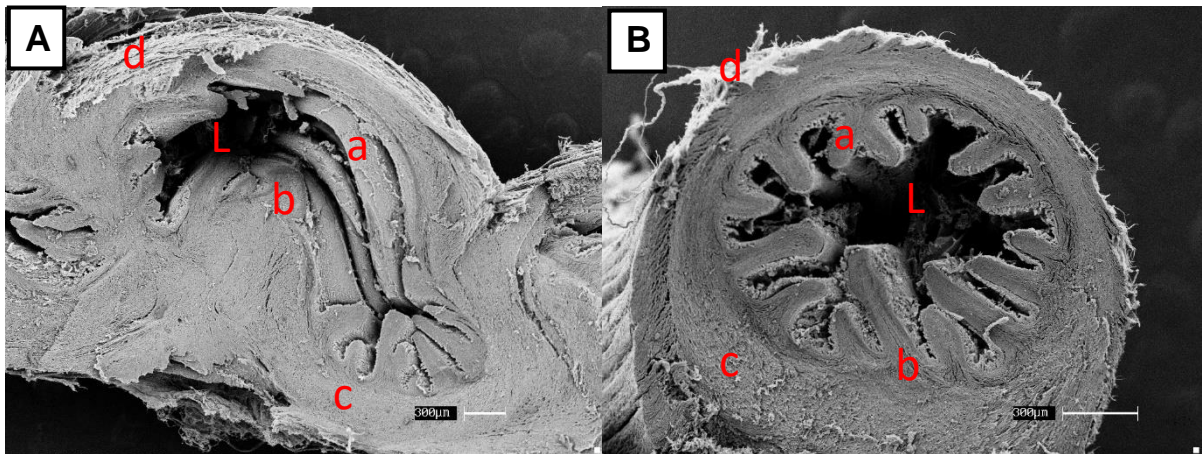


Fonte: SOUZA, E. 2020

3.1.2 Aspecto microscópico do UMT

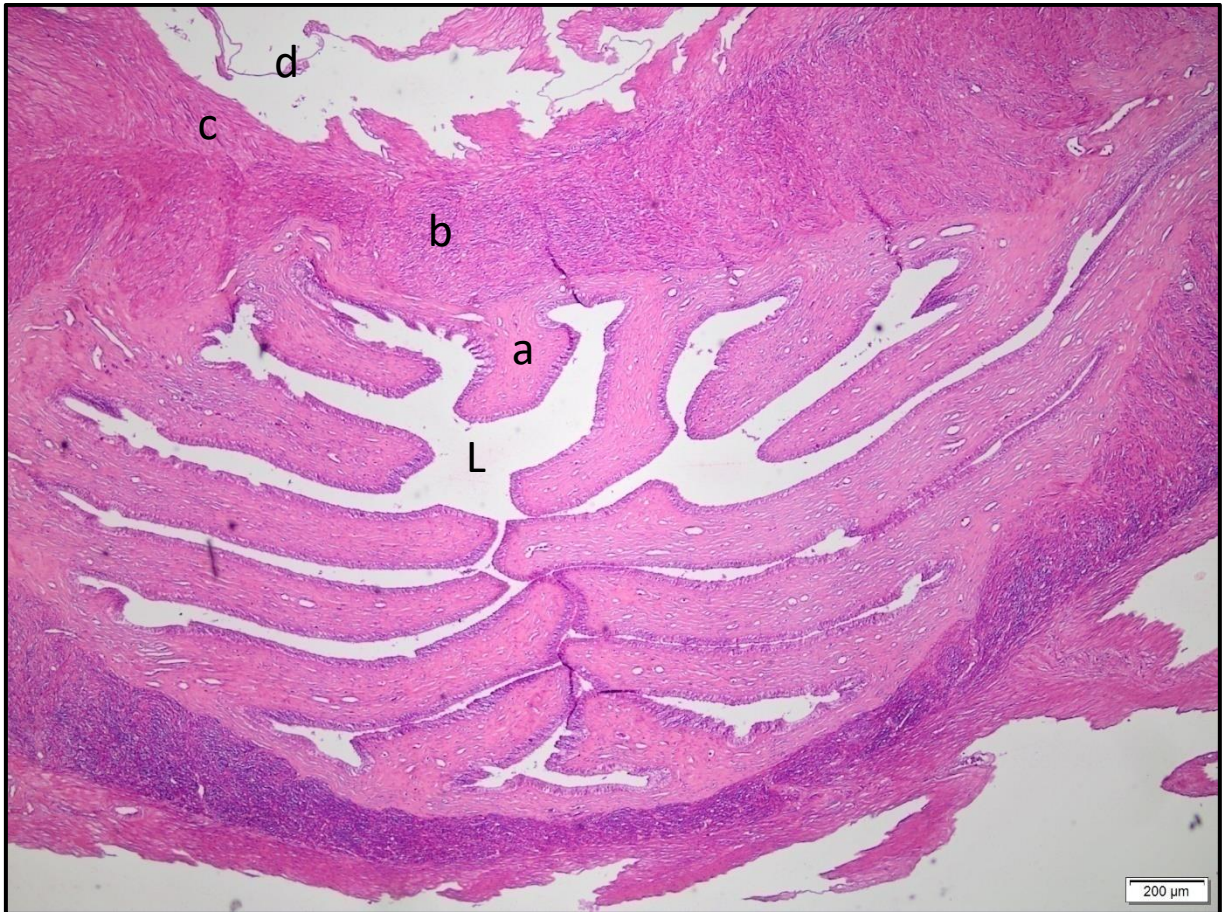
Histologicamente, a região do útero aglandular onde é formado o UMT é constituída, da camada mais interna à mais externa, de mucosa, tecido muscular circular, tecido muscular longitudinal e serosa (Figura 2.3 A e B; Figura 2.4).

Figura 2.3 – Microscopia Eletrônica de Varredura da região do útero aglandular onde é formado a UMT em *Lachesis muta*. Aumento 300 μm . A) Corte longitudinal. B) Corte transversal. Legenda: a=mucosa; b=tecido muscular circular; c=tecido muscular longitudinal; d=serosa; L=lúmen.



Fonte: LOBO, L. M. (2019)

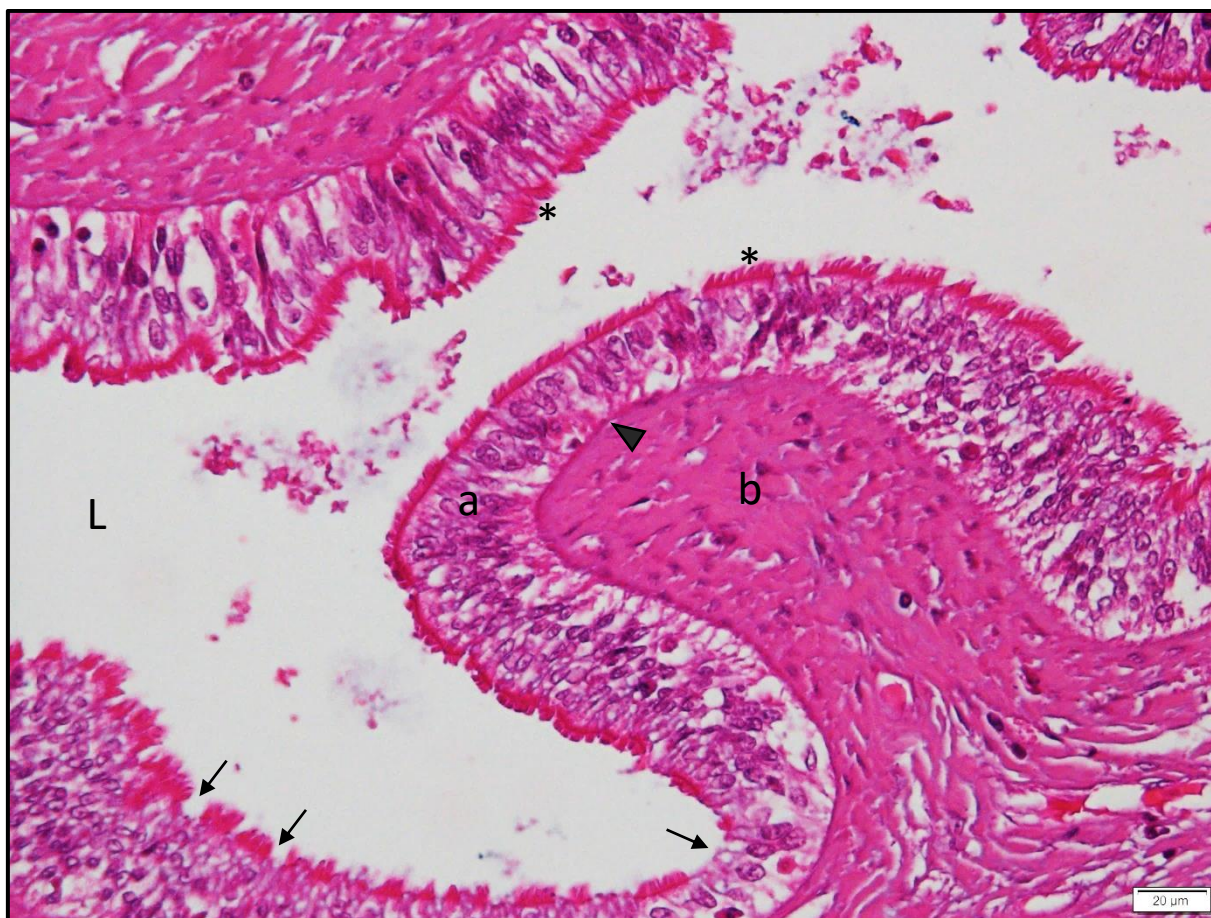
Figura 2.4 – Região do útero aglandular onde é formado a UMT em *Lachesis muta*. Corte transversal. Hematoxilina e Eosina. Aumento 4x. Legenda: a=mucosa; b=tecido muscular circular; c=tecido muscular longitudinal; d=serosa; L=lúmen.



Fonte: SOUZA, E. 2020.

A mucosa que reveste toda a região do UMT caracteriza-se por um epitélio pseudoestratificado, formado por células colunares ciliadas e não-ciliadas, e pelo tecido conjuntivo denso (Figura 2.5).

Figura 2.5 – Região do útero aglandular onde é formado a UMT em *Lachesis muta*. Corte longitudinal. Hematoxilina e Eosina. Aumento 40x. Legenda: a=epitélio pseudoestratificado colunar; b=tecido conjuntivo denso; L=lúmen; →=células não-ciliadas; asteriscos(*)=cílios; ►=lâmina própria.



Fonte: SOUZA, E. 2020

3.2 Estocagem de espermatozoides no oviduto

Este é o primeiro relato de estocagem de espermatozoides no oviduto de serpentes do gênero *Lachesis*. Foram encontrados espermatozoides em cinco fêmeas avaliadas, uma estava prenhe, uma em V1 e três em V2 (Tabela 2.2). Duas observações foram feitas na região do infundíbulo posterior (IP) e três na região do UMT.

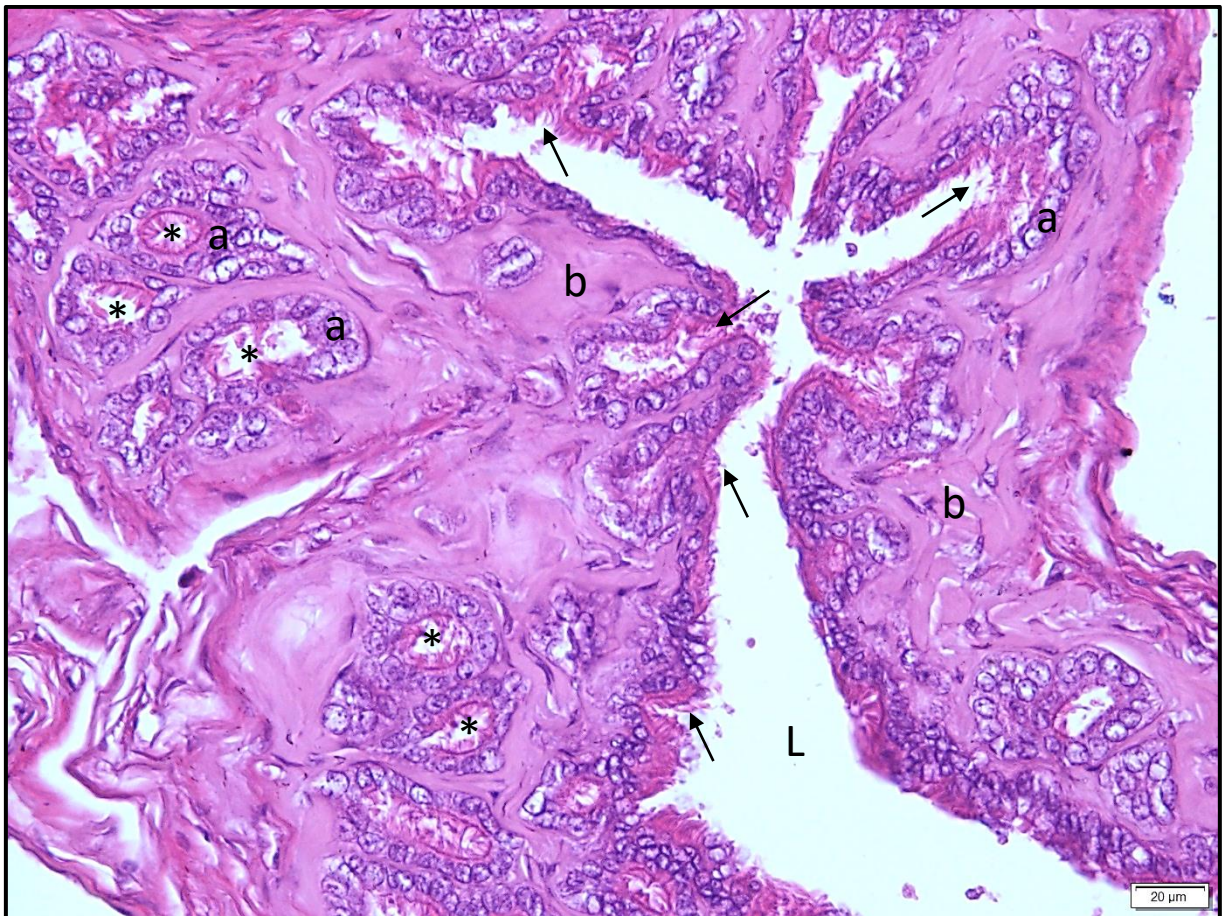
Tabela 2.2 - Espécimes de *Lachesis muta* com estocagem de espermatozoides. (T/C=número de tombo/ coleção; CRC=comprimento rostro-cloacal; E. R.=estágio reprodutivo – prenhe, V1 – vitelogênese primária, V2 – vitelogênese secundária; UMT=uterine muscular twisting, sim – presente, não – ausente; Região=hábitat, FA – Amazônia, MA – Mata Atlântica; Sptz=presença de espermatozoides, UMT – uterine muscular twisting, IP – infundíbulo posterior).

T/C	CRC (mm)	Mês	E. R.	UMT	Região	Sptz
45997/IBU	1830	Agosto	Prenhe	Sim	FA	UMT
19122/MPEG	1970	Março	V1	Sim	FA	IP
16514/MPEG	1830	Maio	V2	Sim	FA	UMT
21684/MPEG	1830	Maio	V2	Não	FA	IP
9313/MZUESC	1565	Setembro	V2	Não	MA	UMT

Fonte: SOUZA, E. 2020.

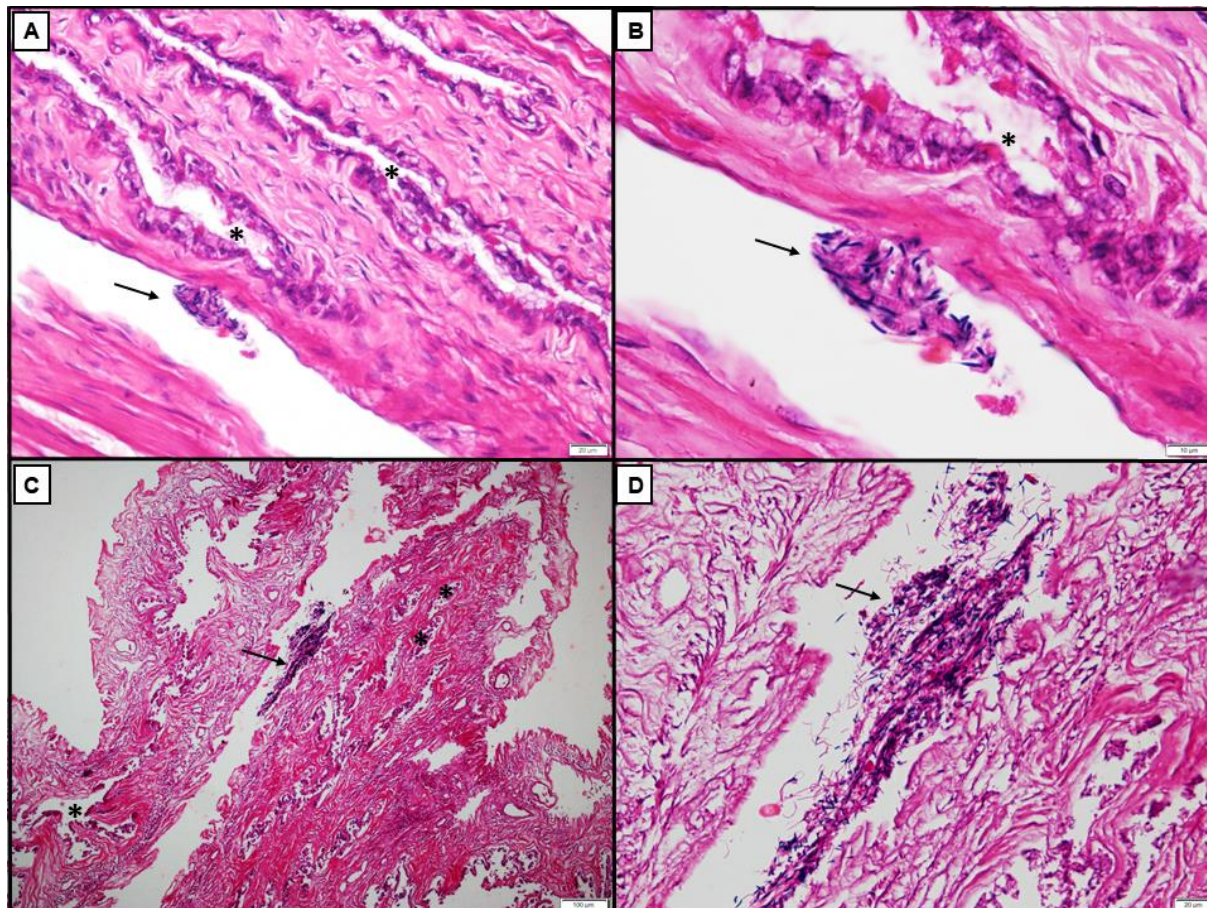
O IP apresenta inúmeras invaginações ciliadas e túbulos de estocagem de espermatozoides (SSTs) constituídos de epitélio cuboide simples ciliado envolto por tecido conjuntivo denso (Figura 2.6). Apesar de inúmeros SSTs terem sido observados na região, nenhuma fêmea apresentou espermatozoides estocados nessas estruturas e, quando presente, estavam no lúmen do órgão (Figura 2.7 A, B, C e D).

Figura 2.6 – Corte longitudinal da região do infundíbulo posterior. Hematoxilina e eosina. Aumento 40x.
Legenda: a=epitélio cuboide simples ciliado; b=tecido conjuntivo denso; L=lúmen; asteriscos (*)=túbulos de estocagem de espermatozoides vazios; setas (→)=cílios.



Fonte: SOUZA, E. 2020

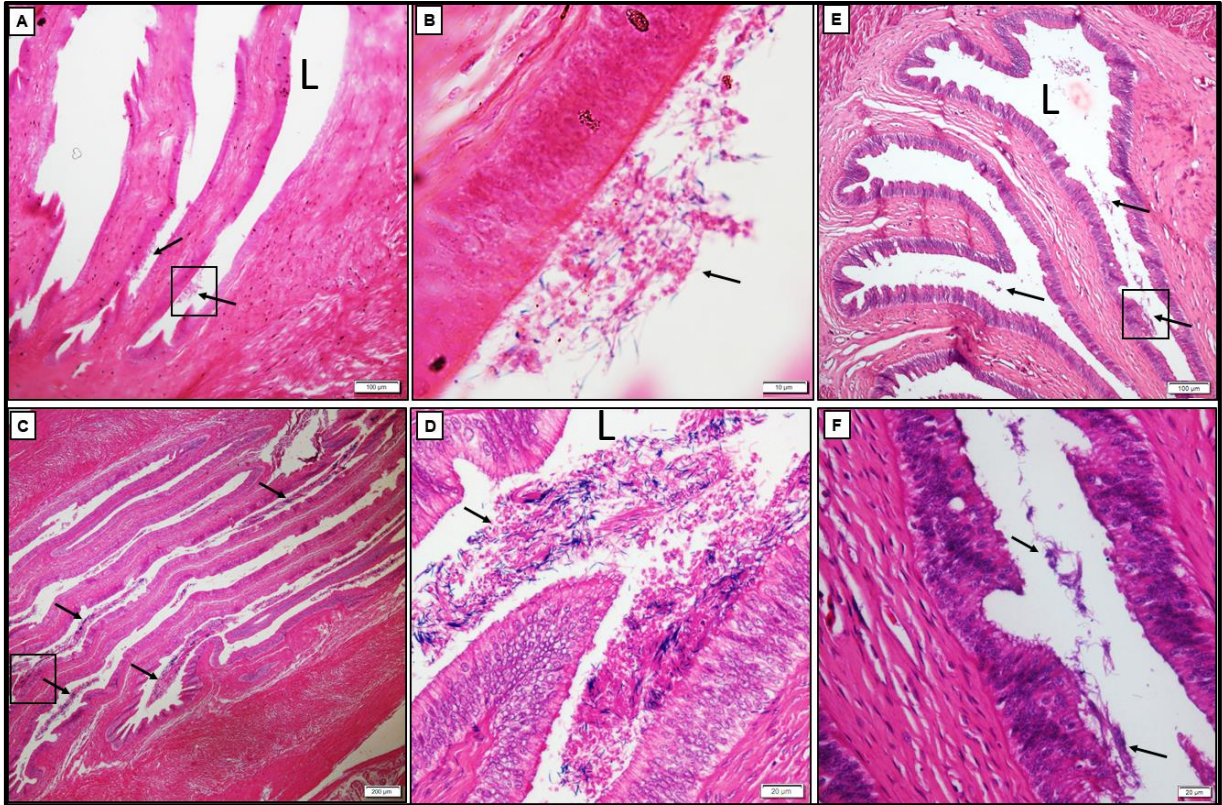
Figura 2.7 – Estocagem de espermatozoides no infundíbulo posterior de *Lachesis muta*. Corte longitudinal. Hematoxilina e Eosina. Legenda: setas (→) =espermatozoides; asteriscos(*)=invaginações ciliadas e/ou SSTs vazios. A) Fêmea em V1 (40x). B) Maior aumento de A (100x). C) Fêmea em V2 (20x). D) Maior aumento de C (40x).



Fonte: SOUZA, E. 2020.

No UMT, uma quantidade reduzida de espermatozoides foi encontrada em uma fêmea prenhe (Figura 2.8 A e B) e em uma fêmea em V2 avançada (Figura 2.8 E e F), cujo maior folículo tinha o tamanho de 49,91 mm. Grande quantidade de espermatozoides foi encontrada em uma fêmea em V2 (Figura 2.8 C e D), cujo maior folículo tinha o tamanho de 38,59 mm.

Figura 2.8 – Estocagem de espermatozoide no UMT de *Lachesis muta*. Corte longitudinal. Hematoxilina e eosina. Legenda: setas (→) =espermatozoides; L=lúmen. Quadrados= regiões em maior aumento. A) Fêmea prenhe (10x). B) Maior aumento de A (100x). C) Fêmea em V2 (4x). D) Maior aumento de C (40x). E) Fêmea em V2 (10x). F) Maior aumento de E (40x).



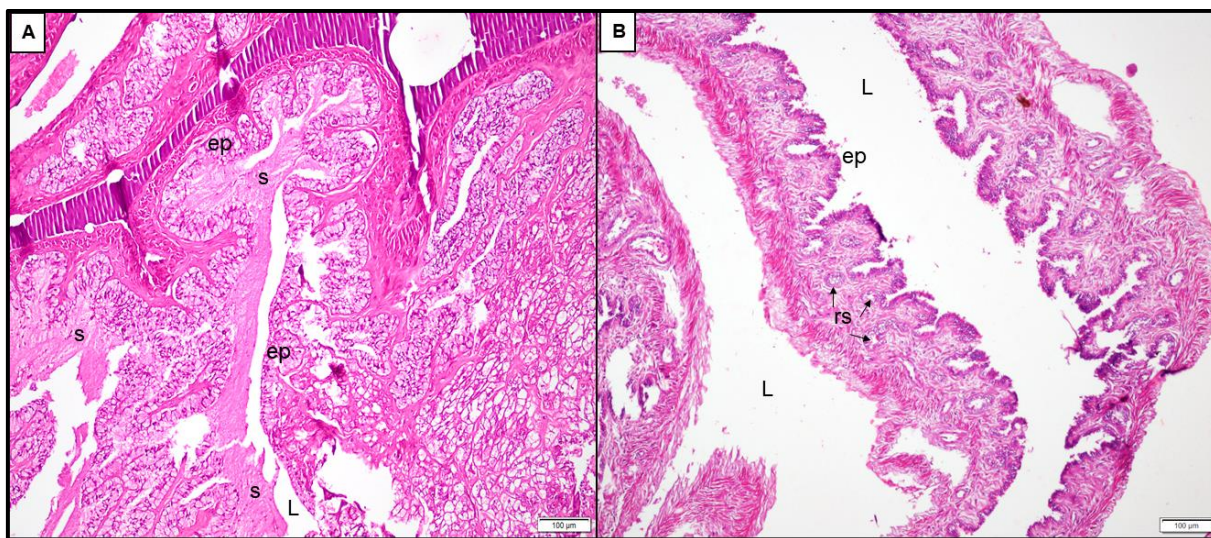
Fonte: SOUZA, E. 2020.

3.3 Alterações secretórias no oviduto ao longo do ciclo reprodutivo

3.3.1 Infundíbulo posterior

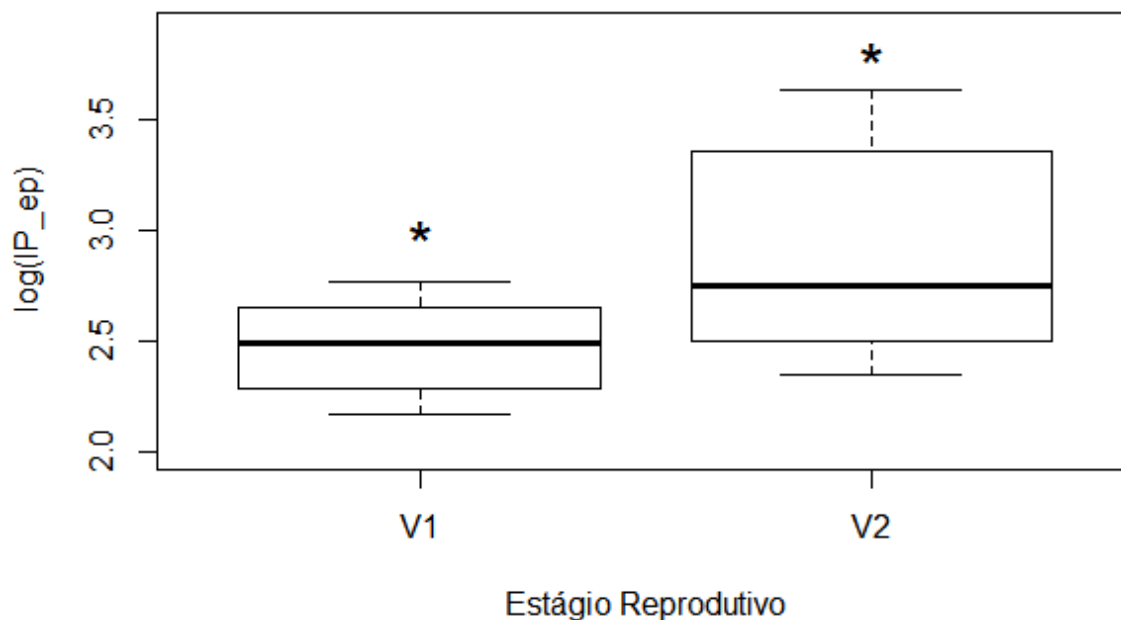
Observamos que o epitélio do infundíbulo posterior aumenta consideravelmente de tamanho nas fêmeas em V2, quando comparado com as fêmeas em V1. É possível visualizar o aumento do epitélio e secreções que preenchem o lúmen do órgão (Figura 2.9). Os resultados estatísticos do teste não paramétrico de Mann Whitney Wilcox sugerem diferença significativa nas médias da altura do epitélio desse órgão entre os dois períodos reprodutivos ($W = 36$, $p = 0,02463$; Figura 2.10). O valor médio para as fêmeas em V1 foi de $12,141 \mu\text{m}$ e para as fêmeas em V2 foi de $20,645 \mu\text{m}$.

Figura 2.9 – Infundíbulo posterior. Corte longitudinal. Hematoxilina e Eosina. Aumento 10x. A) Vitelogênese secundária. B) Vitelogênese primária. Ep = epitélio, s = secreção, L = lúmen, SSTs = túbulos de estocagem de espermatozoides.



Fonte: SOUZA, E. 2020

Figura 2.10 – Média e variação da altura do epitélio do infundíbulo posterior. Eixo x = estágio reprodutivo, V1 = vitelogênese primária, V2 = vitelogênese secundária. Eixo y = log do comprimento do epitélio do infundíbulo posterior. Asterisco (*) = diferença significativa.

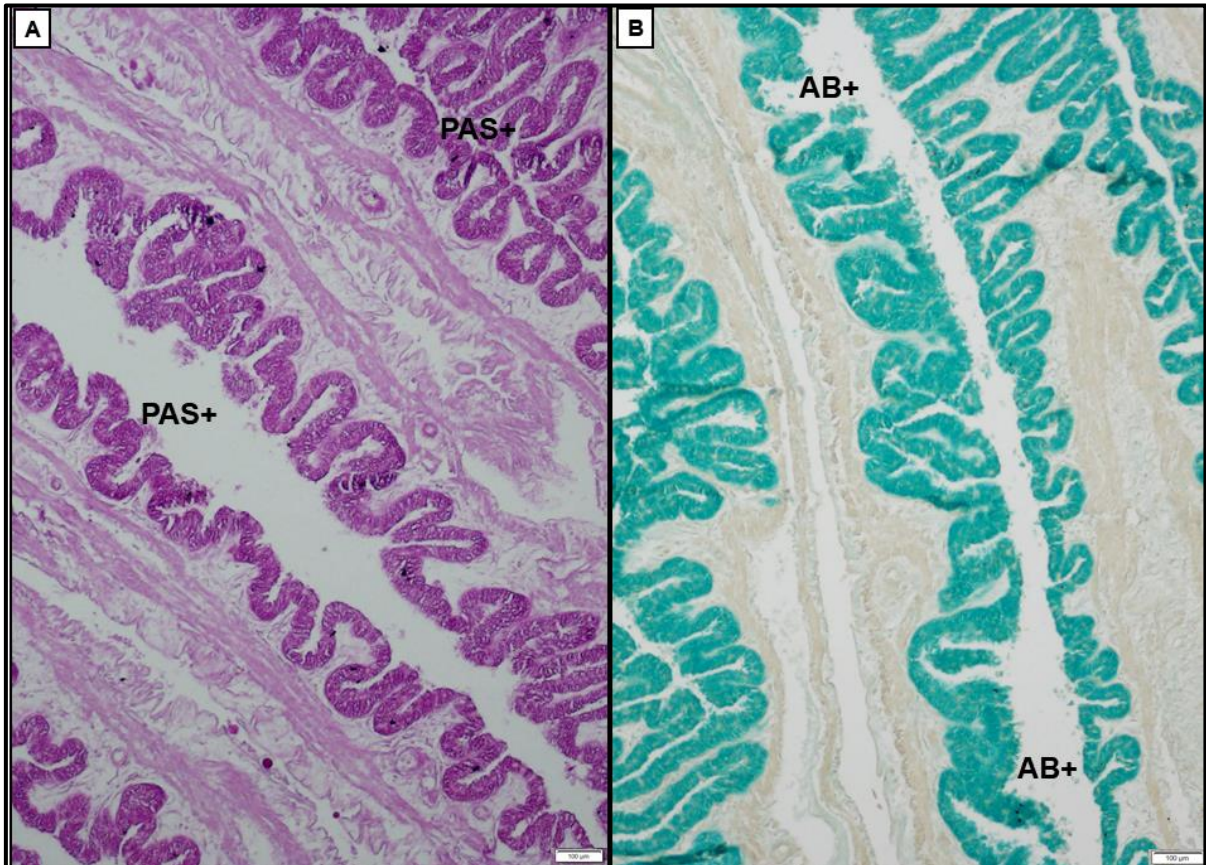


Fonte: SOUZA, E. 2020

Na análise histoquímica, o epitélio do infundíbulo posterior teve reação positiva intensa para o PAS e o AB nos estágios de V2 (Figura 2.11 A e B) e prenhez (Figura 2.12 A e

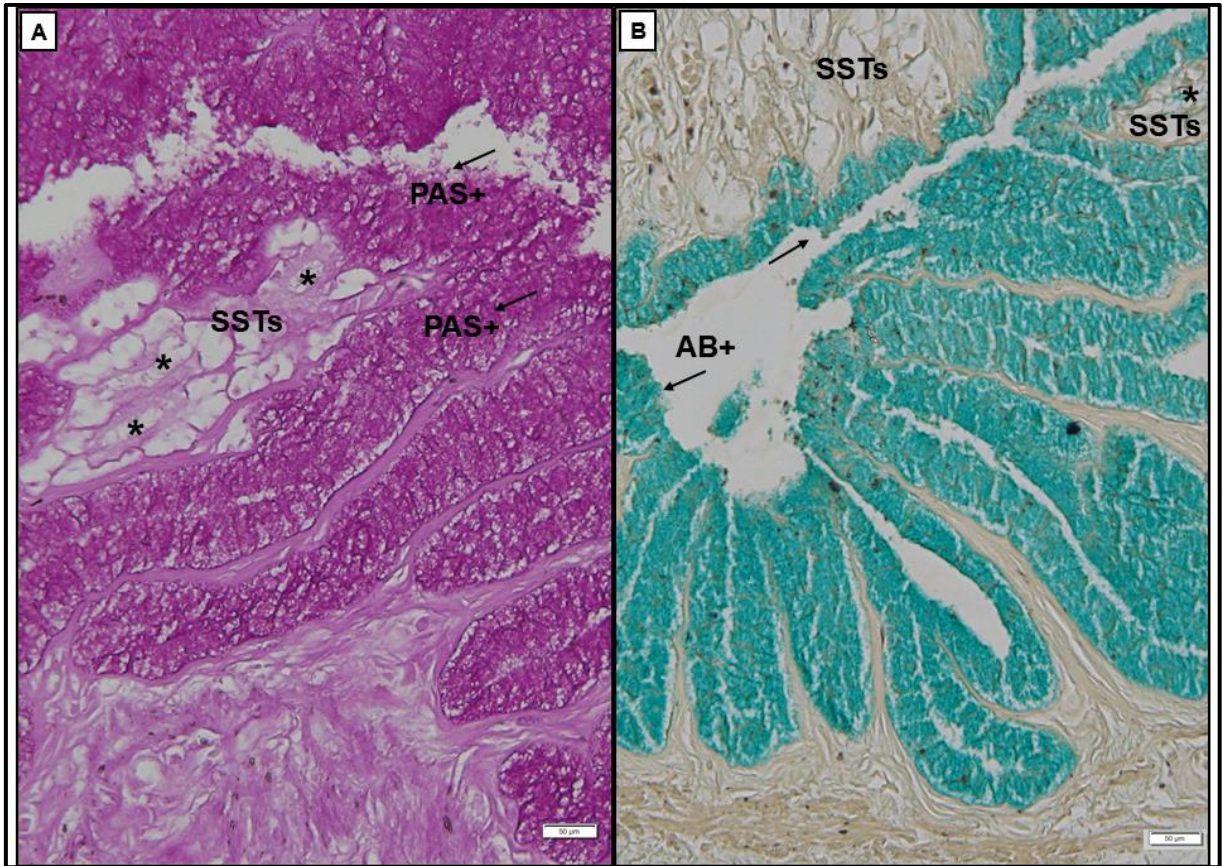
B), porém não foi reativo para BB em nenhum estágio do ciclo reprodutivo (Figura 2.13 A, B e C). Os SSTs não foram reativos com nenhum corante.

Figura 2.11 – Infundíbulo posterior de *Lachesis muta* em estágio de vitelogênese secundária (V2) indicando reação positiva para PAS e AB na região epitelial. Corte longitudinal. Aumento 10x. PAS+ = reação positiva para PAS; AB+ = reação positiva para AB.



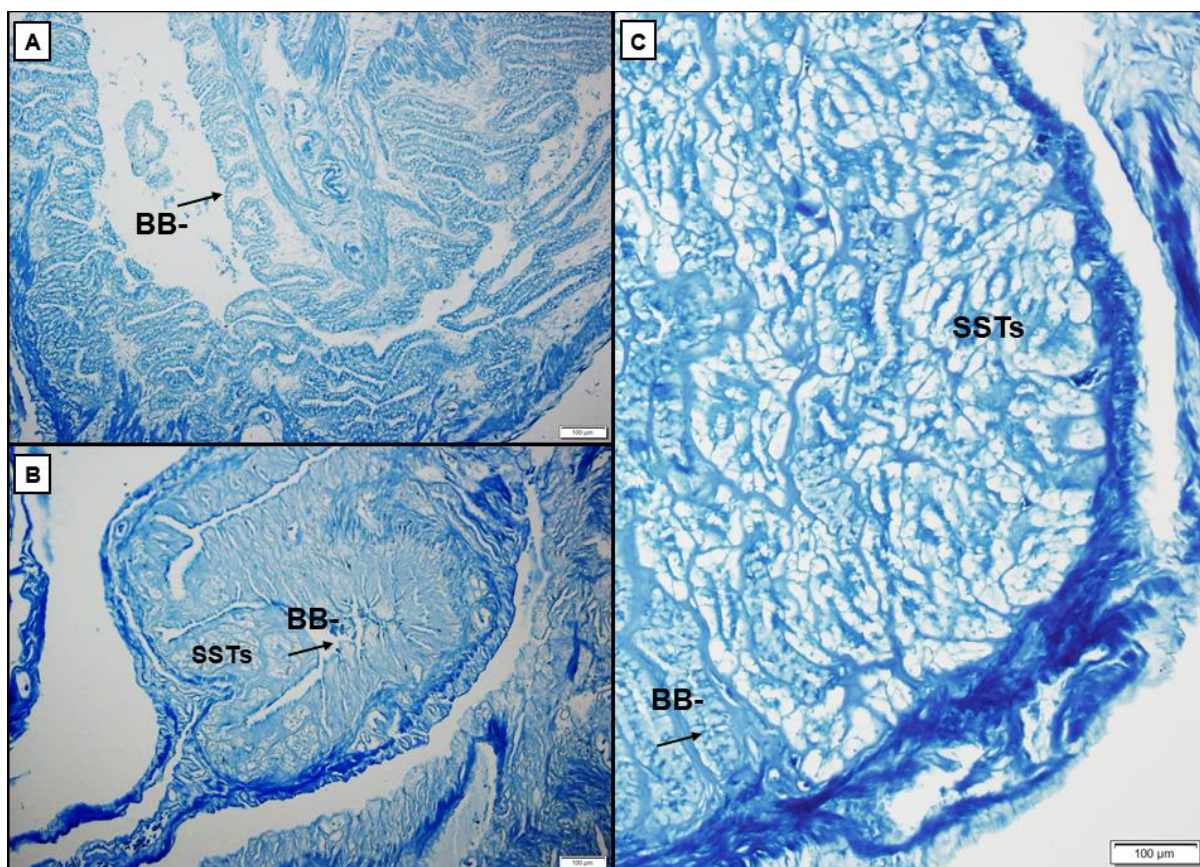
Fonte: SOUZA, E. 2020

Figura 2.12 – Infundíbulo posterior de *Lachesis muta* em estágio de prenhez indicando reação positiva para PAS e AB na região epitelial. Corte longitudinal. Aumento 20x. PAS+= reação positiva para PAS. Asterísco(*)=túbulos de estocagem de espermatozoides. Setas(→)= tecido epitelial do infundíbulo posterior A) PAS+; B) AB+



Fonte: SOUZA, E. 2020.

Figura 2.13 – Infundíbulo posterior de *Lachesis muta* em diferentes estágios reprodutivos em reação negativa para BB na região epitelial(setas). Corte longitudinal. 10x. BB= reação negativa para BB. SSTs = túbulos de estocagem de espermatozoides. A) Fêmea em V1; B) Fêmea em V2; C) Fêmea prenhe.

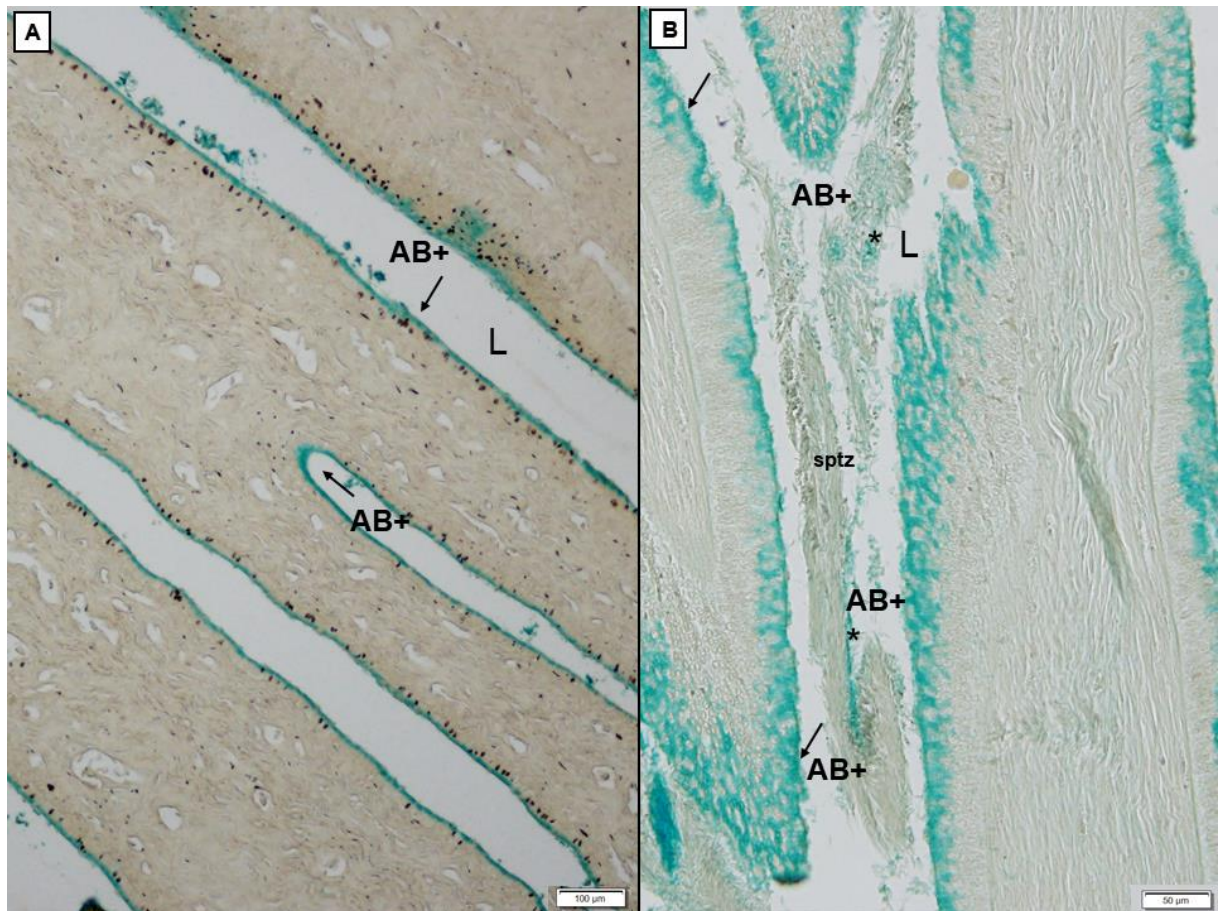


Fonte: SOUZA, E. 2020.

3.3.2 UMT

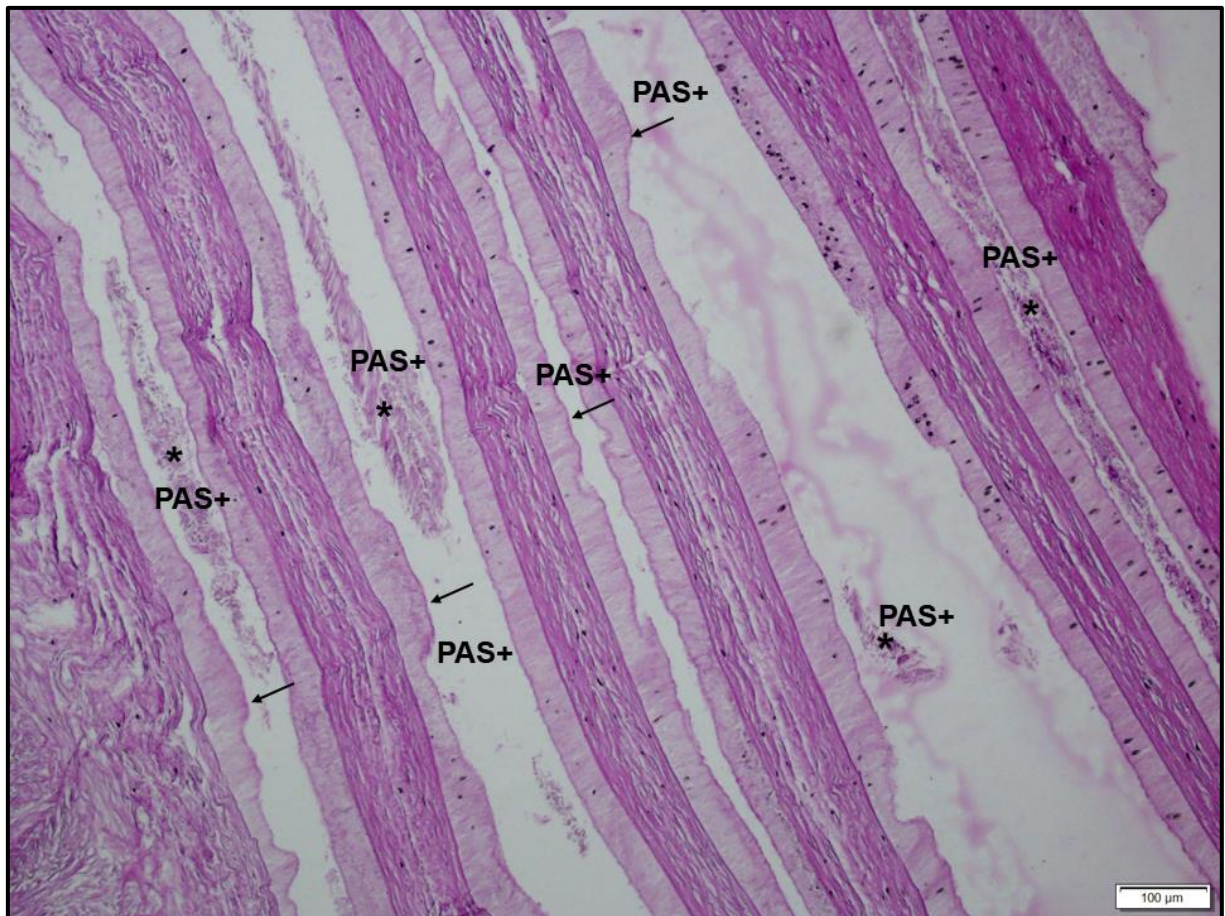
Na análise histoquímica, o epitélio do UMT teve reação positiva moderada para o AB nos estágios de V1 e intensa no estágio de V2 (Figura 2.14 A e B), reagindo inclusive com os espermatozoides presentes no lúmen (Figura 2.14 B). O PAS foi levemente reativo para o epitélio do UMT, apenas na região apical das células epiteliais no estágio de V2, eteve reação positiva com os espermatozoides presentes no lúmen (Figura 2.15). O BB não foi reativo em nenhum estágio do ciclo reprodutivo (Figura 2.16 A, B e C).

Figura 2.14 – UMT de *Lachesis muta* em diferentes estágios reprodutivos em reação positiva para AB na região epitelial, indicado pelas setas (→). A) Fêmea em V1 (10x); L=lúmen. B) Fêmea em V2 (20x). Asteriscos (*) indicam reação positiva para AB nos espermatozoides; L=lúmen; sptz = espermatozoides.



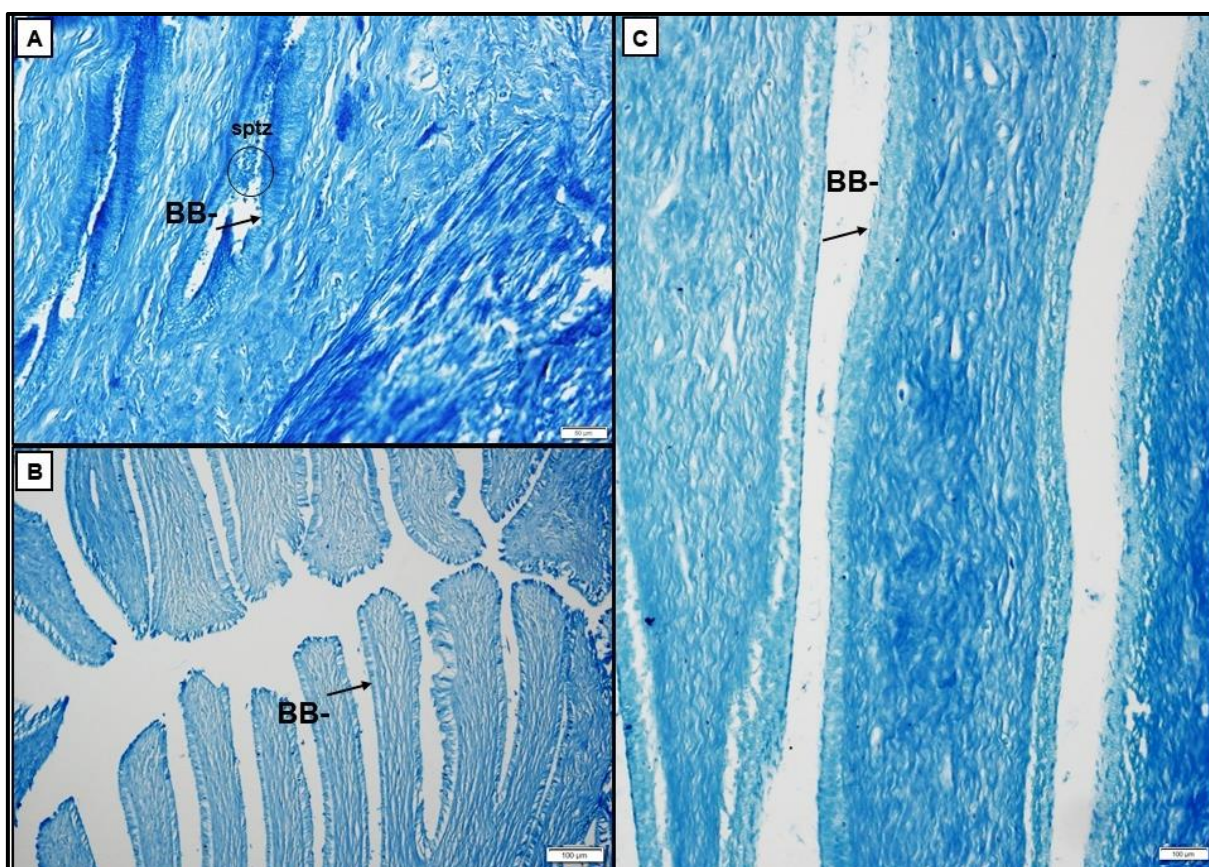
Fonte: SOUZA, E. 2020.

Figura 2.15 – UMT de *Lachesis muta* em reação positiva para o PAS. Corte longitudinal. 10x. PAS+ na região epitelial (setas). PAS+ no aglomerado de espermatozoides (*).



Fonte: SOUZA, E. 2020.

Figura 2.16 – UMT de *Lachesis muta* em diferentes estágios do ciclo reprodutivo em reação negativa para BB na região epitelial, indicado pelas setas (→). A) Fêmea prenhe com espermatozoides indicados pelo círculo (Longitudinal, 20x). B) Fêmea em V1 (Transversal, 10x). C) Fêmea em V2 (Longitudinal, 10x).

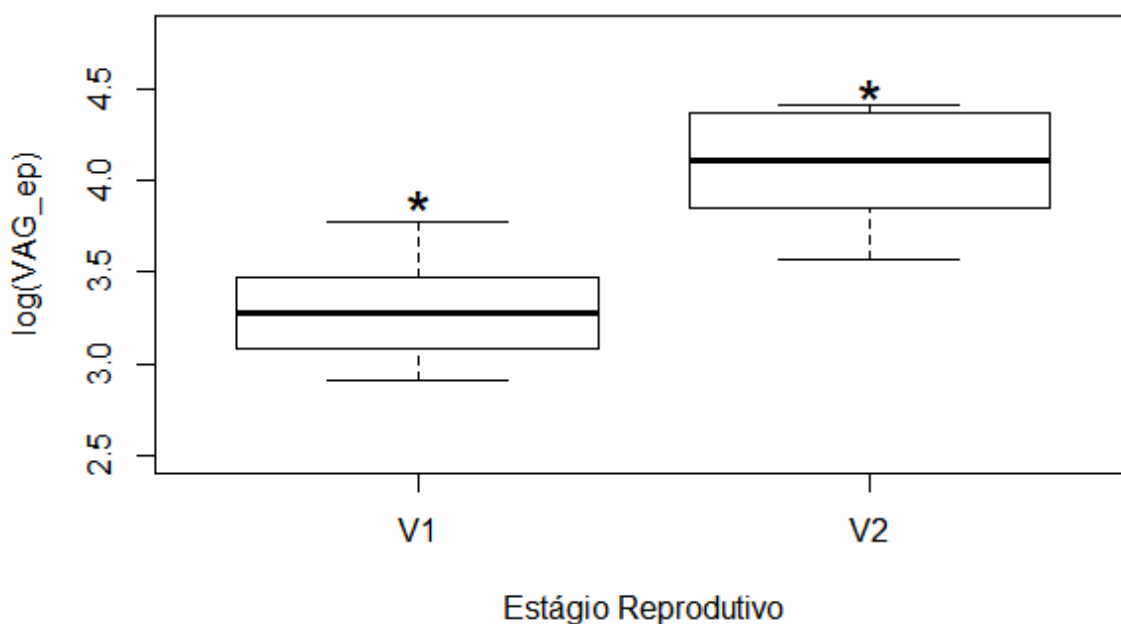


Fonte: SOUZA, E. 2020.

3.3.3 Vagina e plug copulatório

As medidas microscópicas do epitélio vaginal também tiveram diferença significativa entre o período de V1 e V2 ($t = -5,5119$, $gL = 18$, $p < 0,00001$; Figura 2.17). O valor médio para a altura do epitélio vaginal nas fêmeas em V1 foi $28,258 \mu\text{m}$ e para as fêmeas em V2 foi $61,491 \mu\text{m}$.

Figura 2.17 – Média e variação da altura do epitélio da vagina. Eixo x = estágio reprodutivo, V1 = vitelogênese primária, V2 = vitelogênese secundária. Eixo y = log do comprimento do epitélio da vagina. Asterisco (*) = diferença significativa.



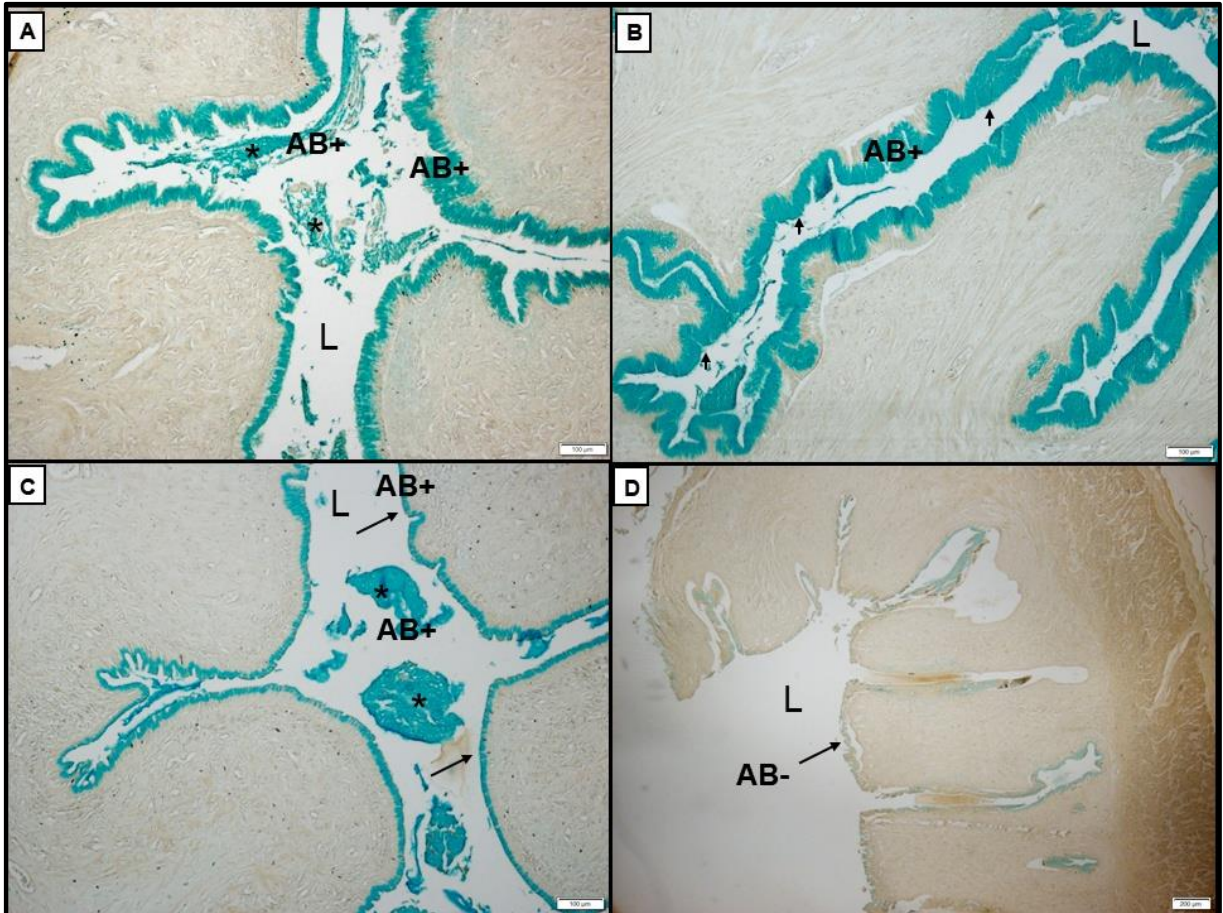
Fonte: SOUZA, E. 2020

Na análise histoquímica, o epitélio vaginal demonstrou alteração na atividade secretória ao longo das diferentes fases do ciclo reprodutivo e de acordo com a presença ou ausência de plug copulatório. Foram avaliadas quatro fêmeas da FA plug na região da vagina, o qual foi intensamente reativo para os testes histoquímicos de AB, PAS e BB. Duas fêmeas em início de V2 e coletadas no mês de julho e setembro. As duas fêmeas restantes foram coletadas nos meses de maio e julho, sendo que uma delas estava em V1 e, para a outra, não foi possível determinar o estágio folicular. Não foram encontrados espermatozoides no plug ou em nenhuma outra região do oviduto dessas fêmeas.

Para o AB, o epitélio vaginal teve reação positiva quando a fêmea estava em V2, tanto na presença quanto na ausência de plug (Figura 2.18 A e B), e em V1 apenas na presença de plug copulatório (Figura 2.18 C e D). Em relação ao PAS, a reação foi positiva em V1 e em V2, na presença e na ausência de plug copulatório (Figura 2.19 A, B, C e D). Já o BB reagiu positivamente com o plug copulatório, porém com o epitélio secretor da vagina a reação foi de leve a moderada quando na presença do plug (Figura 2.20 A, B e C), ou negativa quando na ausência (Figura 2.20 D), tanto em V1 quanto em V2.

Figura 2.18 – Vagina de *Lachesis muta* em diferentes estágios do ciclo reprodutivo em reação positiva para AB na região epitelial, indicado pelas setas (\longrightarrow) e no plug copulatório, indicado pelo asterisco (*). Corte longitudinal. L=lúmen. AB+= reação positiva para AB. AB-= reação negativa para AB.

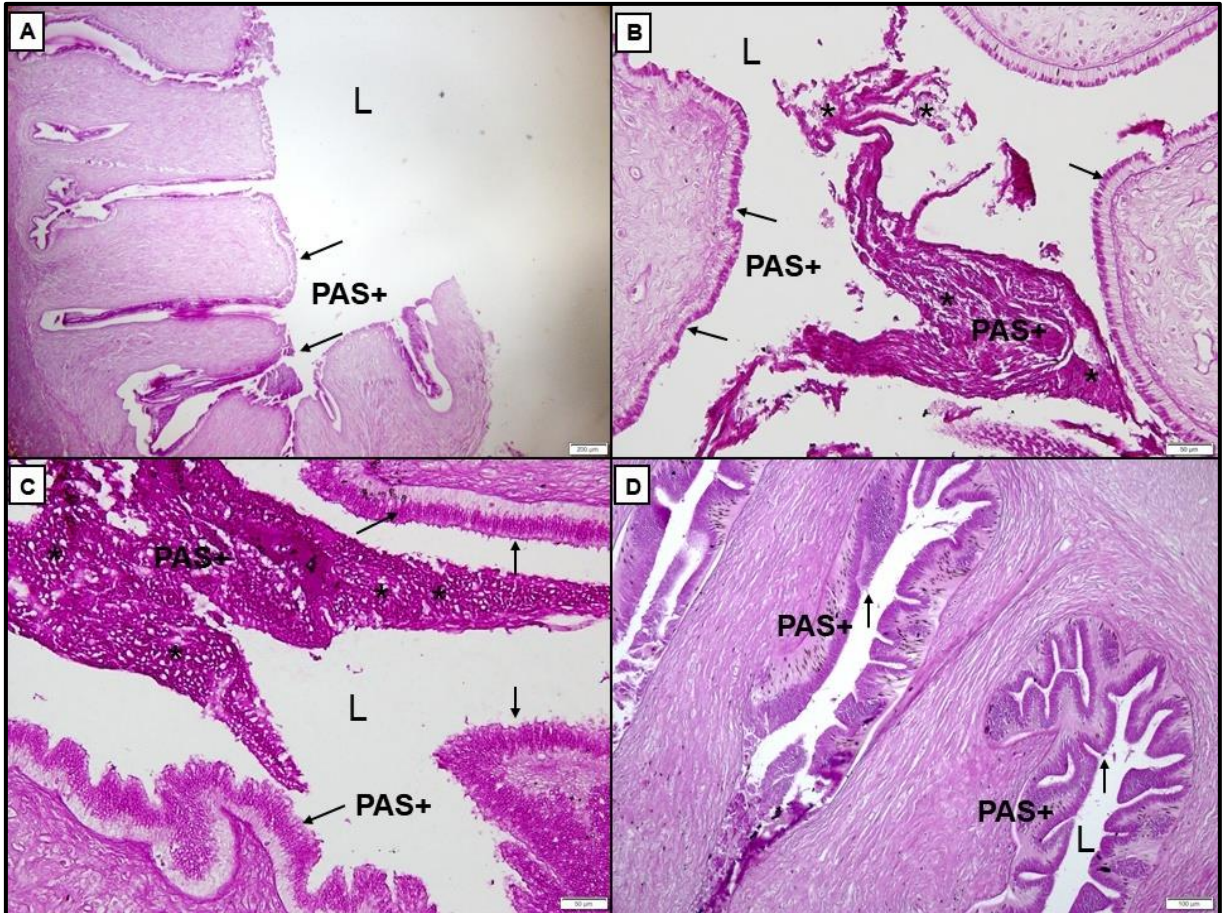
A) Fêmea em V2 com plug (10x). B) Fêmea em V2 sem plug (10x). C) Fêmea em V1 com plug (10x). D) Fêmea em V1 sem plug e AB- (Corte transversal, 4x).



Fonte: SOUZA, E. 2020.

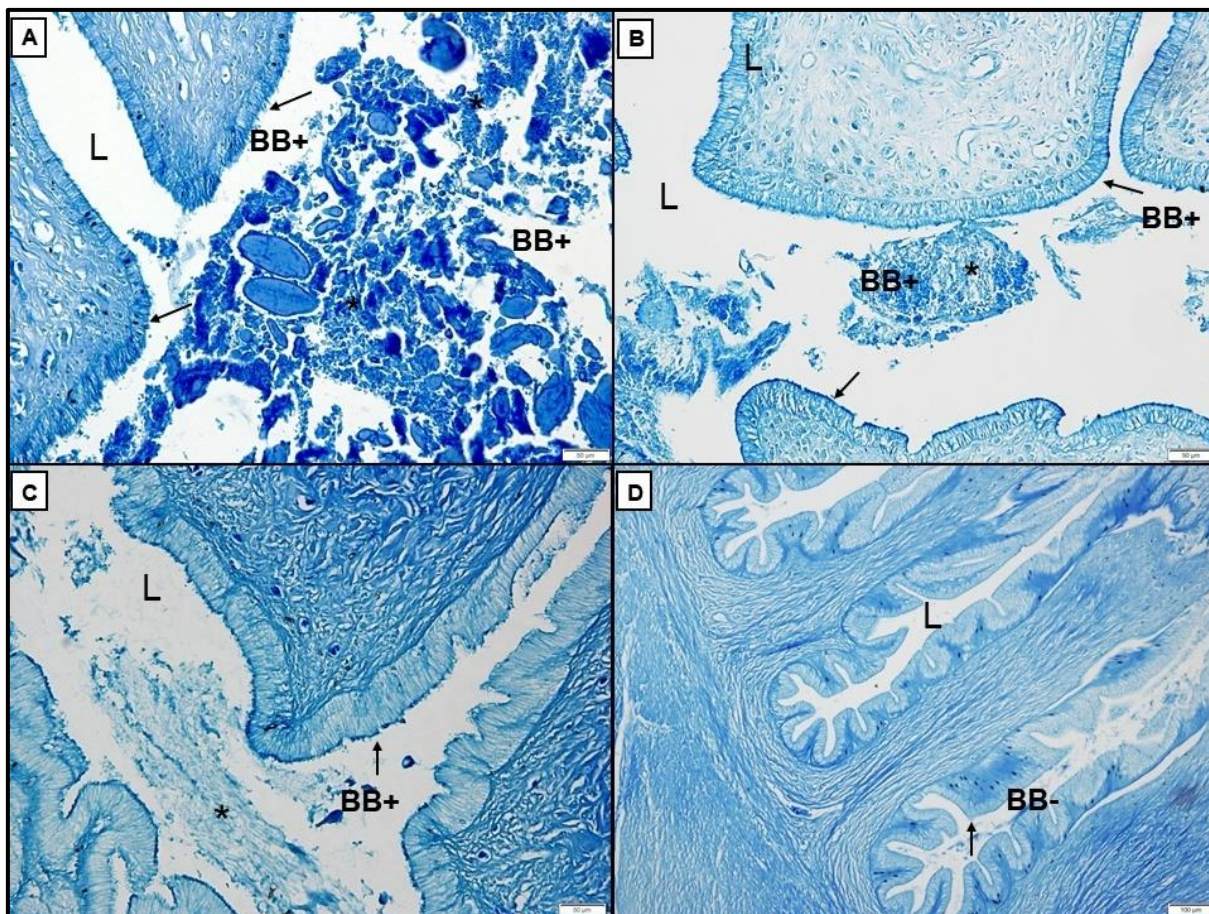
Figura 2.19 – Vagina de *Lachesis muta* em diferentes estágios do ciclo reprodutivo em reação positiva para PAS na região epitelial, indicado pelas setas (→) e no plug copulatório, indicado pelo asterisco (*). Corte longitudinal. L=lúmen. PAS+= reação positiva para PAS.

A) Fêmea em V1 sem plug (Corte transversal, 4x). B) Fêmea em V1 com plug (20x). C) Fêmea em V2 com plug (20x). D) Fêmea em V2 sem plug (10x).



Fonte: SOUZA, E. 2020.

Figura 2.20 – Vagina de *Lachesis muta* em diferentes estágios do ciclo reprodutivo em reação positiva para AB na região epitelial, indicado pelas setas (\longrightarrow) e no plug copulatório, indicado pelo asterisco (*). Corte longitudinal. L=lúmen. BB+= reação positiva para BB. BB-= reação negativa para BB. A) Fêmea em V1 com plug (20x). B) Fêmea em V1 com plug (20x). C) Fêmea em V2 com plug (20x). D) Fêmea em V2 sem plug e BB- (10x).



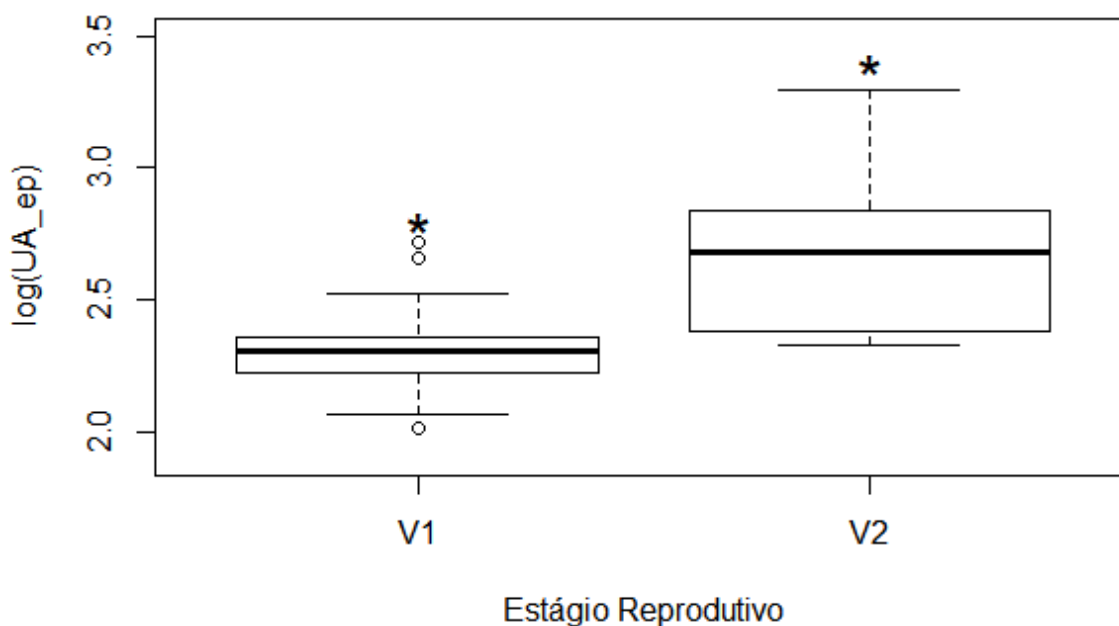
Fonte: SOUZA, E. 2020

3.3.4 Útero glandular

A região do útero glandular apresentou diversas modificações ao longo dos diferentes estágios reprodutivos das fêmeas de *Lachesis muta*. Tais modificações ocorreram tanto em relação ao número e ao tamanho das glândulas que estão presentes no órgão, quanto em relação à atividade secretora das glândulas e do epitélio uterino. As medidas microscópicas tanto da altura do epitélio quanto do diâmetro das glândulas mucosas mostraram diferenças significativas entre os períodos de V1 e V2. No caso das medidas da altura do epitélio, os valores médios para as fêmeas em V1 foi de 10,335 μm e para as fêmeas em V2 foi de 15,371 μm ($t = -3,7031$, $gL = 23$, $p = 0,001172$; Figura 2.21). Para o diâmetro das glândulas, o valor

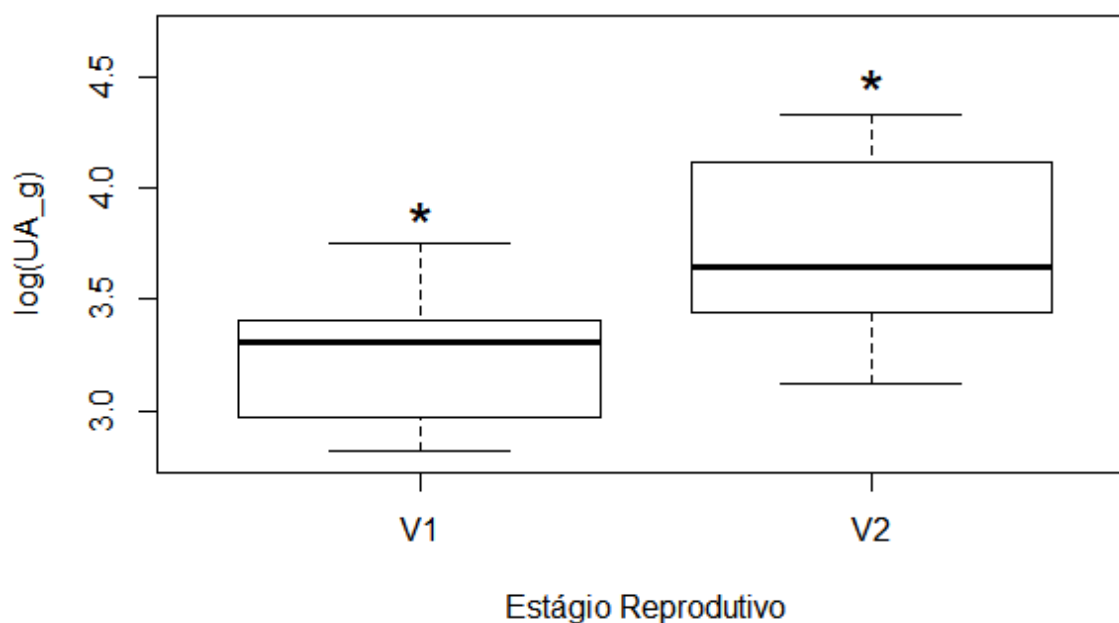
médio para fêmeas em V1 foi de 26,315 μm e para fêmeas em V2 foi de 46,083 μm ($t = -3,9039$, $gL = 24$, $p = 0,0006716$; Figura 2.22).

Figura 2.21 – Média e variação da altura do epitélio do útero glandular. Eixo x = estágio reprodutivo, V1 = vitelogênese primária, V2 = vitelogênese secundária. Eixo y = log da altura do epitélio do útero glandular. Asterisco (*) = diferença significativa.



Fonte: SOUZA, E. 2020

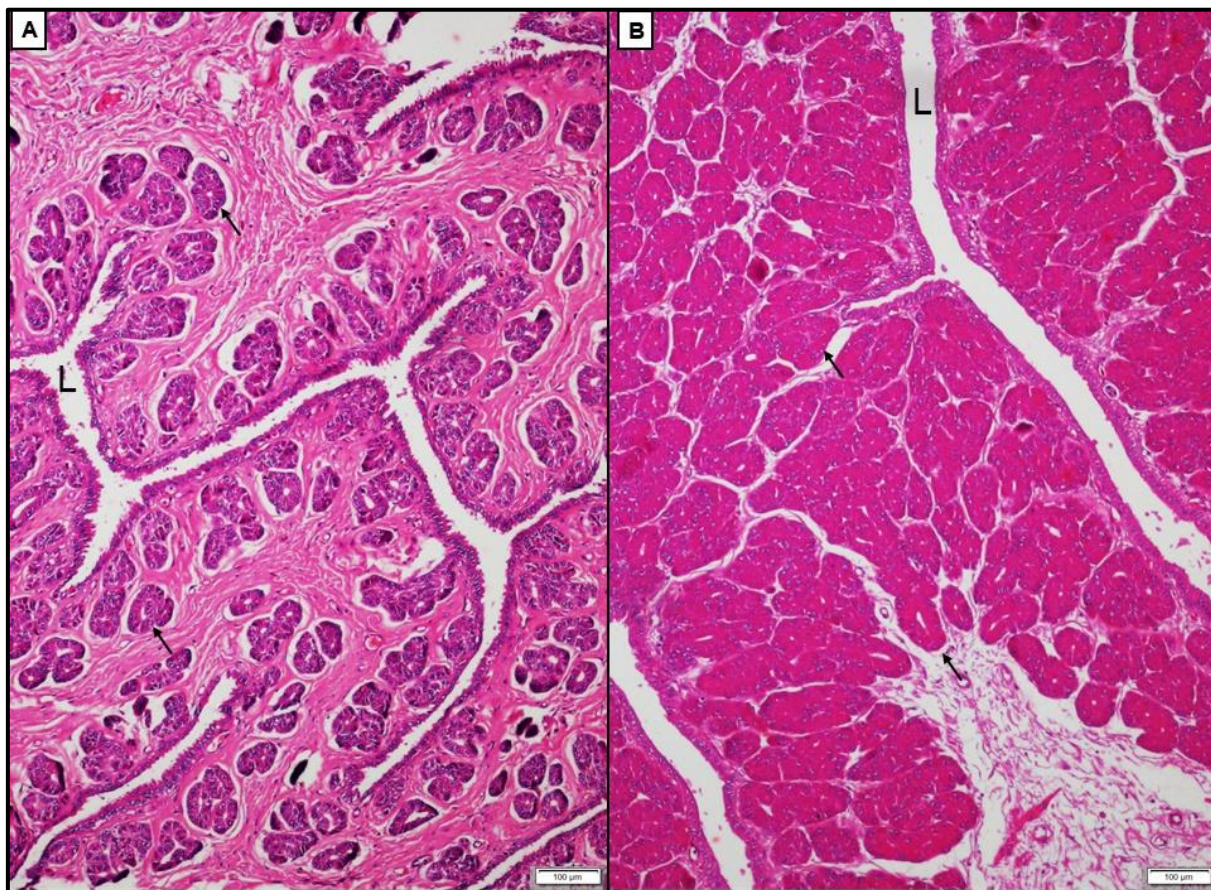
Figura 2.22 – Média e variação do diâmetro das glândulas do útero glandular. Eixo x = estágio reprodutivo, V1 = vitelogênese primária, V2 = vitelogênese secundária. Eixo y = log do diâmetro das glândulas do útero glandular. Asterisco (*) = diferença significativa.



Fonte: SOUZA, E. 2020

Fêmeas no estágio de V2 apresentaram visualmente uma quantidade maior de glândulas na região da mucosa do útero, e a espessura da camada glandular maior quando comparada a outras fêmeas em V1, além de glândulas mais acidófilas (Figura 2.23 A e B).

Figura 2.23 – Útero glandular de *Lachesis muta* em diferentes estágios do ciclo reprodutivo. Corte Longitudinal. Hematoxilina e Eosina. Setas (→) indicam glândulas uterinas. L=lúmen. A) Fêmea em V1 (10x). B) Fêmea em V2 (10x).



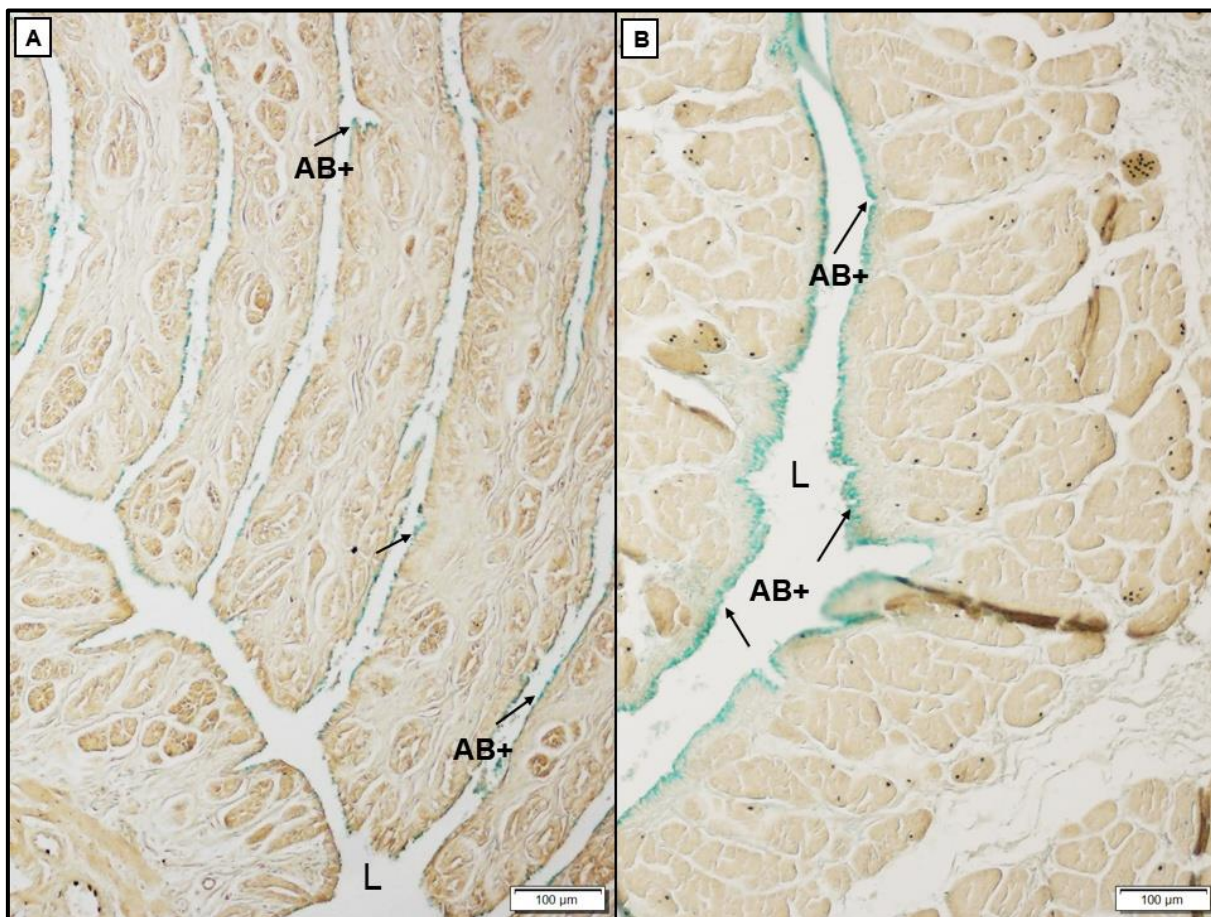
Fonte: SOUZA, E. 2020

Para os testes de histoquímica, a região do útero glandular foi positivamente reativa para os três tipos de corantes utilizados (AB, PAS e BB) tanto em fase de vitelogênese primária quanto em vitelogênese secundária, porém a intensidade diferiu consideravelmente entre os dois estágios reprodutivos.

O epitélio do útero glandular foi moderadamente reativo para o AB na fase de V2 (Figura 2.24 A e B). As glândulas do útero glandular e a região apical do epitélio foram intensamente reativas para o PAS na fase de V2 e moderadamente reativas na fase de V1 (Figura 2.25 A e B). Já para o BB, as glândulas e a região apical do epitélio foram

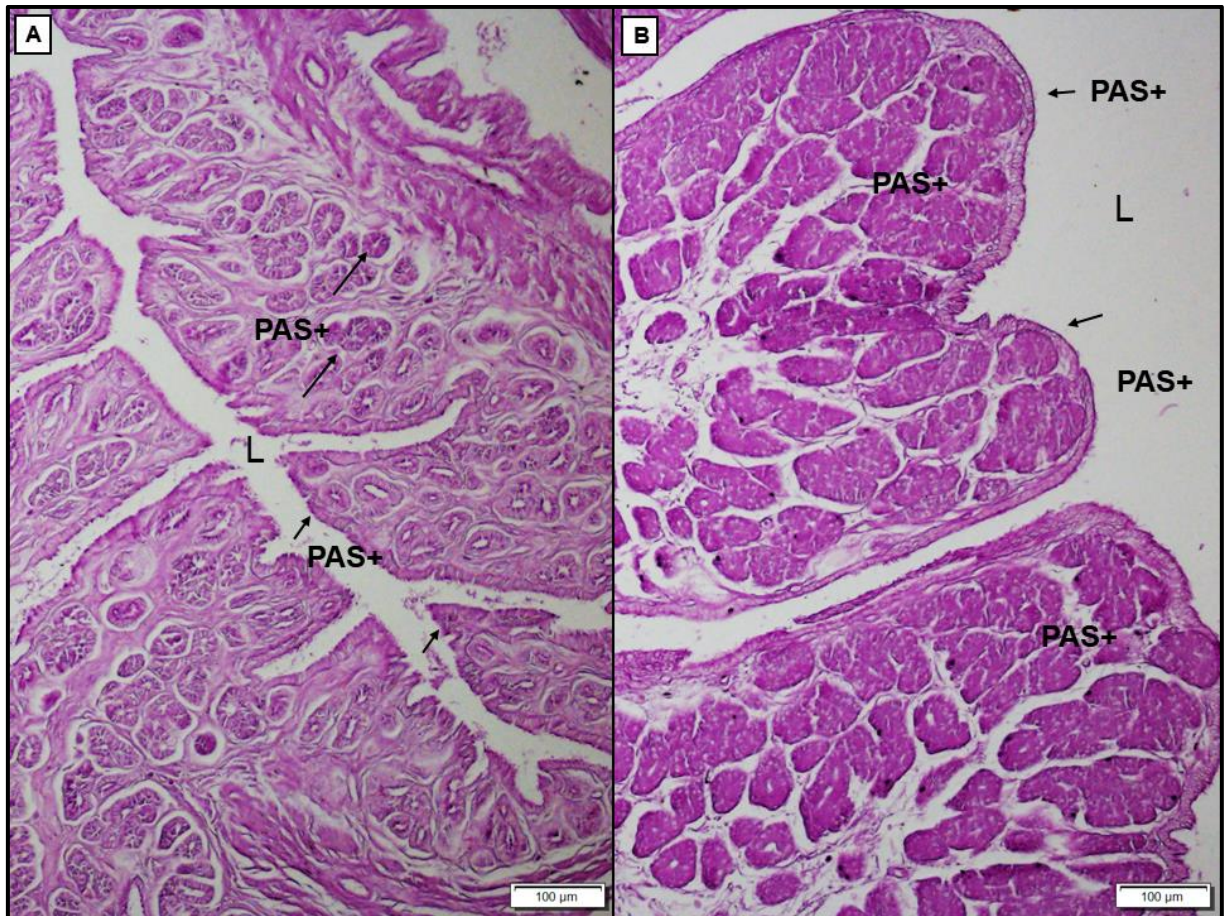
moderadamente reativas na fase de V2 e levemente reativas na fase de V1 (Figura 2.26 A e B).

Figura 2.24 – Útero glandular de *Lachesis muta* em diferentes estágios do ciclo reprodutivo em reação positiva para o AB na região epitelial, identificada pelas setas (→). Corte Longitudinal. L=lúmen. AB+= reação positiva para AB. A) Fêmea em V1 (10x). B) Fêmea em V2 (10x).



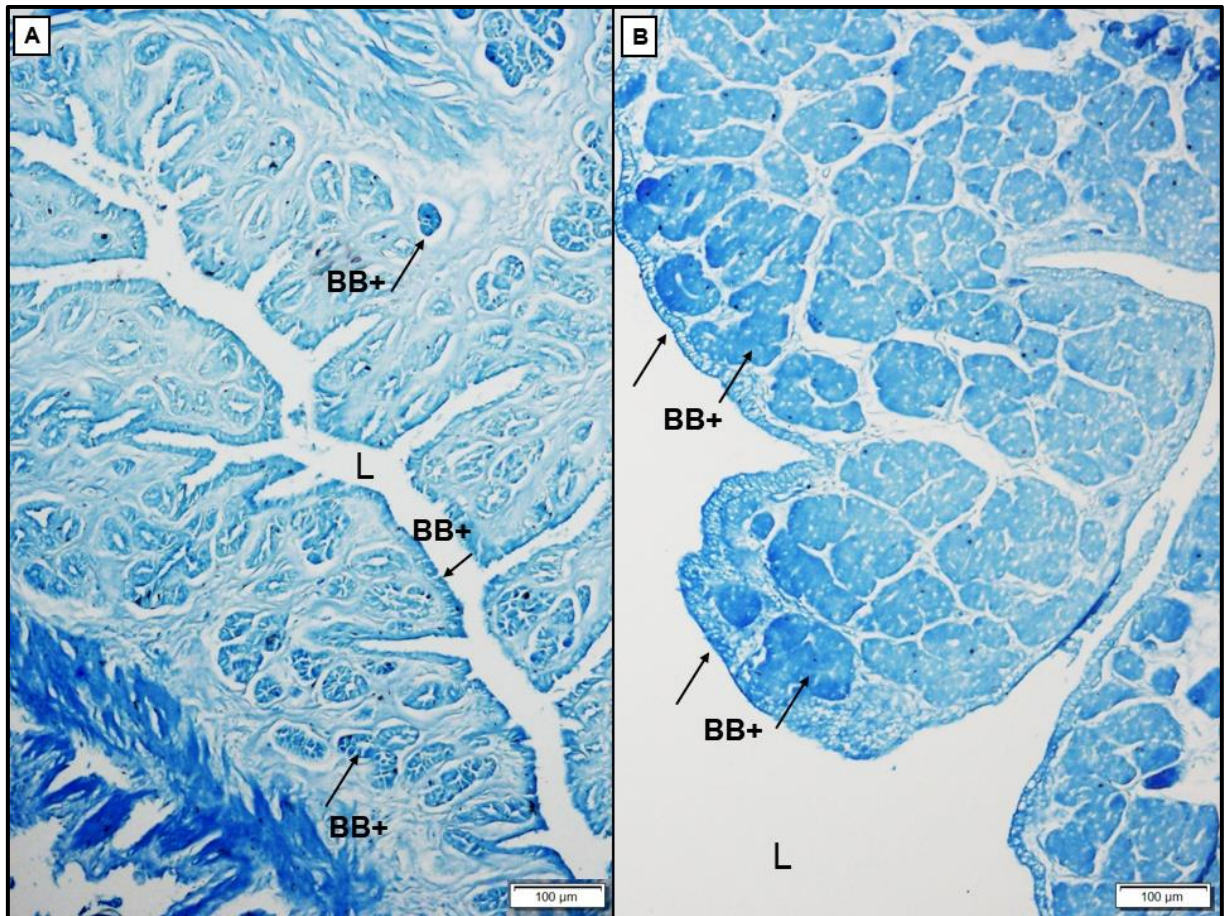
Fonte: SOUZA, E. 2020.

Figura 2.25 – Útero glandular de *Lachesis muta* em diferentes estágios do ciclo reprodutivo em reação positiva para o PAS na região glandular, identificada pelas setas (→). Corte Longitudinal. L=lúmen. PAS+= reação positiva para PAS. A) Fêmea em V1 (10x). B) Fêmea em V2 (10x).



Fonte: SOUZA, E. 2020.

Figura 2.26 – Útero glandular de *Lachesis muta* em diferentes estágios do ciclo reprodutivo em reação positiva para o AB na região glandular, identificada pelas setas (→). Corte Longitudinal. L=lúmen. BB+= reação positiva para BB. A) Fêmea em V1 (10x). B) Fêmea em V2 (10x).



Fonte: SOUZA, E. 2020.

3.4 Resumo das alterações secretórias no oviduto ao longo do ciclo reprodutivo

A seguir, a Tabela 2.3 resume os resultados histoquímicos encontrados no oviduto de *L. muta*. A determinação da intensidade da reação com cada corante foi feita de acordo com uma adaptação de Rojas et al. (2013) e Silva et al. (2019).

Tabela 2.3 – Resumo das alterações secretórias que foram observadas no oviduto e nas estruturas encontradas (i.e., plug copulatório, UMT e espermatozoides) ao longo do ciclo reprodutivo das fêmeas de *Lachesis muta*. Legenda: E.R. = estágio reprodutivo: V1, vitelogênese primária; V2, vitelogênese secundária; P, prenhe; PAS=ácido periódico de Schiff; AB=Alcian Blue; BB=Bromofenol Blue; *** = reação intensa; ** = reação moderada; * = reação fraca; - = reação negativa; # = reação positiva apenas na presença de plug copulatório.

Estrutura	E. R.	PAS	AB	BB
Infundíbulo posterior	V1	-	-	-
	V2	***	***	-
	P	***	***	-
UMT	V1	-	**	-
	V2	*	***	-
Epitélio vaginal	V1	*	**#	*#
	V2	**	***	*#
Útero glandular (epitélio)	V1	**	*	*
	V2	***	**	**
Útelo glandular (glândulas)	V1	**	-	*
	V2	***	-	**
Plug copulatório		***	***	***
Espermatozóides		***	***	-

Fonte: SOUZA, E. 2020.

4 DISCUSSÃO

A *uterine muscular twisting* (UMT) é uma modificação na parte aglandular do útero possivelmente associada à maturidade sexual das fêmeas, quando os níveis médios dos hormônios sexuais aumentam e estimulam a formação da estrutura (MUNIZ-DA-SILVA, 2016; YAMANOUYE et al., 2004). Durante a época de gravidez, níveis elevados de progesterona relaxam a musculatura do útero aglandular, relaxando também a UMT (MUNIZ-DA-SILVA, 2016). O hormônio P4, principal progesterona encontrada nas serpentes, está em nível baixo no início da gestação e aumenta progressivamente até atingir o pico hormonal, próximo ao segundo terço da gestação (ALDRIDGE, 2011; HIGHFILL; MEAD, 1975; CHAN; ZIEGEL; CALLARD, 1973). No presente trabalho, observamos a UMT em uma fêmea prenhe de *Lachesis muta*. Silva et al. (2019a) também encontraram uma fêmea prenhe

de *Bothrops atrox* com a estrutura presente. A fêmea prenhe encontrada aqui possivelmente estava no início da gravidez, uma vez que não foi possível identificar o embrião dentro do maior ovo dissecado (Capítulo 1), o que pode justificar o fato de a UMT ainda não ter se desfeito. Entretanto, tal suposição é especulativa e mais estudos são necessários, uma vez que a biologia endócrina de serpentes e as funções hormonais associadas aos eventos reprodutivos ainda carecem de maior investigação (DENARDO; TAYLOR, 2011), inclusive no que diz respeito à formação da UMT.

A UMT frequentemente é encontrada em várias espécies de viperídeos, como *Bothrops* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002), *Crotalus* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; MUNIZ-DA-SILVA et al., 2018) e *Vipera* (NILSON; ANDRÉN, 1982). A observação dessa estrutura para espécies do gênero *Lachesis* era desconhecida até o momento, e sua ocorrência corrobora a hipótese de que a formação dessa estrutura na região aglandular do útero pode ser um caráter ancestral para o grupo (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002). A função da UMT ainda é discutida por diversos autores, em especial sua possível associação com a estratégia de estocagem de espermatozoides. Seigel e Sever (2006, 2008) argumentam que essa região é apenas um local de passagem dos espermatozoides até que eles alcancem de fato o local de estocagem, o infundíbulo posterior. Almeida-Santos e Salomão (2002) por outro lado, acreditam que essa estrutura desempenha um papel na estocagem de espermatozoides. Em estudos mais recentes, Silva et al. (2019b) atestam que, apesar da UMT não oferecer um completo bloqueio à ascensão do espermatozoide para regiões anteriores do oviduto, é possível que a sua morfologia e caráter secretor contribuam na garantia de um ambiente mais favorável à sobrevivência dos espermatozoides até o momento da fecundação.

No nosso trabalho, cinco fêmeas apresentaram espermatozoides no oviduto, sendo três na região da UMT (uma prenhe e duas em V2) e duas na região do infundíbulo posterior (uma em V1 e uma em V2). Nas duas regiões os espermatozoides não estavam alocados em receptáculos seminais, criptas ou dobras epiteliais. O fato de uma fêmea prenhe ainda ter espermatozoides na região da UMT corrobora a hipótese de que esse local não atua como uma barreira à ascensão dos espermatozoides a regiões mais craniais do oviduto. O esperma encontrado no infundíbulo posterior de uma fêmea em V1 pode ser vestígio de um episódio reprodutivo anterior. Em *Agkistrodon piscivorus*, também foi observado esperma na mesma região até o início da estação reprodutiva seguinte (SIEGEL; SEVER, 2006). Esses resultados indicam que talvez não exista um mecanismo de degradação dos espermatozoides que eventualmente permanecem no oviduto após a fertilização (SIEGEL; SEVER, 2008), já que é

improvável que *L. muta* utilize os mesmos espermatozoides em múltiplas ninhadas em uma mesma estação reprodutiva (Capítulo 1), como pode ser o caso de algumas espécies de serpentes ovíparas neotropicais (ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2015).

A partir das análises do oviduto de *L. muta*, percebemos que todas as regiões do órgão que foram avaliadas se preparam para a reprodução, desde a região mais distal da vagina até a região mais cranial do infundíbulo posterior. As alterações morfo-fisiológicas incluem o aumento da camada epitelial e o aumento da atividade secretória de carboidratos neutros e glicosaminoglicanos carboxilados nas fêmeas em vitelogênese secundária, evidenciados pela intensa reação com o PAS e o Alcian Blue, respectivamente. Essa observação corrobora com estudos anteriores que comprovam a relação entre o aumento da atividade secretória no oviduto e a influência hormonal (GIRLING, 2002; MEAD; EROSCHENKO; HIGHFILL, 1981), pelo aumento nos níveis de estradiol por exemplo, um hormônio abundante na fase de vitelogênese secundária. Entretanto, observamos atividades secretórias em fêmeas em V1 na região epitelial do útero glandular, nas glândulas do útero glandular, na UMT e na vagina.

Atividade secretória contínua no oviduto ao longo das diferentes fases do ciclo reprodutivo pode ocorrer para manter o órgão lubrificado, úmido e protegido contra microrganismos (ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2015). Porém, no caso do epitélio vaginal, a reação positiva para o AB e o BB nas fêmeas em V1 só ocorreu na presença do plug copulatório, o qual é derivado de secreções ricas em proteínas e carboidratos neutros do segmento sexual renal (SSR) dos machos (ALDRIDGE et al., 2011; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2017; ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2013). Para Squamata, ainda não há consenso sobre a funcionalidade dos plugs copulatórios e, uma possibilidade, é que essa estrutura atue como um espermatóforo, liberando gradualmente o esperma no oviduto (FRIESEN et al., 2013). Sendo assim, nossos resultados sugerem que o início da atividade secretória do oviduto pode também ser estimulado por fatores externos, no caso o plug copulatório, indicando uma ligação entre aumento da atividade secretória e a estratégia de estocagem de espermatozoides, onde essas secreções contribuam também na nutrição e movimentação do espermatozoide ao longo do oviduto.

O útero glandular de *Lachesis muta* é um órgão secretor ao longo de todo o ciclo reprodutivo, pois se mostra reativo ao AB, PAS e BB. Porém, sua atividade aumenta na fase de vitelogênese secundária, evidenciada pela hipertrofia das glândulas e do epitélio, assim como pelo aumento da atividade secretória. A reatividade das glândulas uterinas com o BB e PAS indica produção de proteínas e carboidratos neutros, respectivamente, substâncias frequentemente observadas em outras espécies ovíparas (BASSI; COETI; ALMEIDA-

SANTOS, 2020; BRAZ et al., 2018; ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2019) e vivíparas (BRAZ et al., 2018; SIEGEL; SEVER, 2008). Esses compostos constituem a membrana proteica da casca do ovo, a qual varia em espessura dependendo do modo reprodutivo da serpente (BRAZ et al., 2018). Sendo assim, as substâncias que formam a casca do ovo em *L. muta* também derivam de proteínas e carboidratos, como observado para outras espécies de Squamata. Estudos futuros também devem considerar técnicas histoquímicas de marcação para o cálcio.

Túbulos de estocagem de espermatozoides (SSTs) são estruturas que ocorrem na região do infundíbulo posterior de diversas espécies de serpentes (FOX; DESSAUER, 1962). Espermatozoides já foram encontrados dentro desses túbulos em espécies da família Viperidae (*Agkistrodon piscivorus* SIEGEL; SEVER, 2008; *Bothrops alternatus* AMARAL, 2015; *Bothrops atrox* SILVA et al., 2019a). Os SSTs são abundantes no infundíbulo posterior de *L. muta* ao longo de todo o ciclo reprodutivo e, apesar de não termos encontrado espermatozoides dentro dos SSTs, potencialmente podem ser um local de estocagem, já que observamos espermatozoides no lúmen deste órgão. Ao contrário do epitélio do infundíbulo posterior, não observamos atividade secretória nos SSTs. Isso sugere que estes túbulos devem atuar como abrigo mecânico aos espermatozoides, e não nutritivo, como sugerido por Sever e Ryan (1999). Por esse motivo, os espermatozoides não devem permanecer nos SSTs por um longo período.

Uma vez que a época de cópula, final do outono até o inverno, está dissociada da ovulação, final do inverno e início da primavera (Capítulo 1), manter os espermatozoides estocados no oviduto por um longo período (*long-term storage*) parece ser obrigatório para *Lachesis muta*, o que corrobora com a estratégia dos crotalíneos do Novo Mundo. Portanto, sugerimos que tanto a UMT quanto o infundíbulo posterior desempenham um papel importante na estocagem de espermatozoides nas fêmeas de surucucu ao longo do inverno, e isso se dá através do aumento da atividade secretória desses órgãos durante esse período.

Para confirmar nossas proposições, recomendamos que os processos endócrinos e suas relações com características filogenéticas, ecológicas e fisiológicas do grupo *Lachesis* sejam posteriormente mais bem estudados. Também recomendamos uma análise histoquímica do SSR dos machos, a fim de testar a hipótese da formação do plug copulatório. Além disso, outras técnicas de microscopia e um estudo ultraestrutural podem elucidar detalhes sobre as estratégias reprodutivas de *L. muta*.

5 CONCLUSÃO

O oviduto da surucucu-pico-de-jaca apresenta morfologia conservativa em relação a outros Squamata, caracterizada pela composição histológica do órgão e pela característica de mudanças cíclicas na composição histoquímica e morfológica de acordo com mudanças no ciclo reprodutivo.

Auterine muscular twisting – *UMT* – é presente nas fêmeas de *L. muta* da população Amazônica e da Mata Atlântica, e corrobora a hipótese de que esta estrutura seja um caráter ancestral para a família Viperidae.

Fêmeas de *L. muta* são capazes de estocar espermatozoides por um longo período (inverno), e essa estratégia parece estar relacionada com o aumento da capacidade secretória do oviduto, em especial glicosaminoglicanos carboxilados e carboidratos neutros, que oferecem nutrição e mobilidade ao esperma ao longo do oviduto.

Estimulamos estudos que investiguem os processos endócrinos, ultraestruturais e histoquímicos nas gônadas de machos e fêmeas de *L. muta* para elucidar essas hipóteses.

REFERÊNCIAS

- ALDRIDGE, R. et al. The Sexual Segment of the Kidney. In: ALDRIDGE, R.; SEVER, D. M. **Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes**. [s.l.]: CRC Press, 2011. cap.11. p.477–509.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M. et al. Reproductive Biology of the Brazilian Lancehead, *Bothrops moojeni* (Serpentes, Viperidae), from the State of São Paulo, Southeastern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 174–181, 2017.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Long-Term Sperm Storage in the Female Neotropical Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). **Japanese journal of herpetology**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 46–52, 1997.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Reproduction in neotropical pitvipers with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G. W. **Biology of the Vipers**. [s.l: s.n.], 2002. p. 445–462.
- ALVES, F. Q.; ARGÔLO, A. J. S.; CARVALHO, G. C. Reproductive biology of the bushmaster *Lachesis muta* (Serpentes: Viperidae) in the Brazilian Atlantic Forest. **Phyllomedusa**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 99–109, 2014.
- AMARAL, A. On the Oviparity of *Lachesis Muta* Daudin, 1803.” **Copeia**. [s.l.], n. 149, p. 93–94. Dec. 1925. DOI:10.2307/1435593. Disponível em: www.jstor.org/stable/1435593.
- AMARAL, F. M. **Estratégias reprodutivas da serpente *Bothrops alternatus*: influência de fatores ambientais**. 2015. 131p. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive Biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. **Advances in Zoology**, [s. l.], v. 2014, p. 1–11, 2014a.
- BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Mating plugs and male sperm storage in *Bothrops cotiara* (Serpentes, Viperidae). **Herpetological Journal**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 115–119, 2017.
- 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. **Herpetological Journal**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 97–104, 2012.
- BASSI, E. A.; COETI, R. Z.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive cycle and sperm storage of female coral snakes, *Micrurus corallinus* and *Micrurus frontalis*. **Amphibia Reptilia**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 13–27, 2020.
- BLACKBURN, D. G. Structure, Function, and Evolution of the Oviducts of Squamate Reptiles, With Special Reference to Viviparity and Placentation. **The Journal of Experimental Zoology**, [s. l.], v. 282, p. 560–617, 1998.

- BRAZ, H. B. et al. Uterine and eggshell modifications associated with the evolution of viviparity in South American water snakes (*Helicops* spp.). **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, [s. l.], v. 330, n. 3, p. 165–180, 2018.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. New York: Cornell University Press, 2004.
- CHAN, W. C.; ZIEGEL, S.; CALLARD, I. P. Plasma progesterone in snakes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, [s.l.], v. 44, p. 631–637, 1973.
- CORRALES, G.; GÓMEZ, A.; FLORES, D. Reproduction of the South American Bushmaster, *Lachesis muta* (Serpentes: Viperidae), in Captivity. **Herpetological Review**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 608–611, 2016.
- DE SOUZA, R. C. G. Reproduction of the Atlantic Bushmaster (*Lachesis muta rhombeata*) for the First Time in Captivity. **Bull. Chicago Herp. Soc.**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 41–43, 2007.
- DENARDO, D. F.; TAYLOR, E. N. Hormones and Reproduction in Free-ranging Snakes. In: ALDRIDGE, R.; SEVER, D. M. **Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes**. [s.l.]: CRC Press, 2011. cap. 7, p. 265–287.
- FENWICK, A. M.; GREENE, H. W.; PARKINSON, C. L. The serpent and the egg: Unidirectional evolution of reproductive mode in vipers? **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 59–66, 2012.
- FORD, N. B.; SEIGEL, R. A. Offspring Size Variation in Snakes. In: ALDRIDGE, R.; SEVER, D. M. **Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes**. [s.l.]: CRC Press, 2011. cap.14, p. 573–586.
- FOX, W. Seminal receptacles of snakes. **The Anatomical Record**, [s. l.], v. 124, n. 3, p. 519–539, 1956.
- FOX, W.; DESSAUER, H. t C. The Single Right Oviduct and Other Urogenital Structures of Female Typhlops and Leptotyphlops. **Copeia**, [s. l.], v. 1962, n. 3, p. 590, 1962.
- FRIESEN, C. R. et al. Not just a chastity belt: The functional significance of mating plugs in garter snakes, revisited. **Biological Journal of the Linnean Society**, [s. l.], v. 109, n. 4, p. 893–907, 2013.
- GIRLING, J. E. The reptilian oviduct: A review of structure and function and directions for future research. **Journal of Experimental Zoology**, [s. l.], v. 293, n. 2, p. 141–170, 2002.
- GREENE, H. W. **Snakes the evolution of mystery in nature**. [s.l.]: University of California Press, 1997. 351p.
- HALPERT, A. P.; GARSTKA, W. R.; CREWS, D. Sperm transport and storage and its relation to the annual sexual cycle of the female red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*. **Journal of Morphology**, [s. l.], v. 174, n. 2, p. 149–159, 1982.

HIGHFILL, Dick R.; MEAD, Rodney A. Sources and levels of progesterone during pregnancy in the garter snake, *Thamnophis elegans*. **General and Comparative Endocrinology**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 389–400, 1975.

HOLT, William V.; FAZELI, Alireza. Sperm Storage in the Female Reproductive Tract. **The Annual Review of Animal Biosciences**, [s. l.], v. 4, p. 291–310, 2016.

JUNQUEIRA, C. L.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 2008.

LUDWIG, M.; RAHN, H. Sperm Storage and Copulatory Adjustment in the Prairie Rattlesnake. **Copeia**, [s. l.], v. 1943, n. 1, p. 15–18, 1943.

MARINHO, C. E. et al. Peptidase activities in the semen from the ductus deferens and uterus of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, [s. l.], v. 179, n. 5, p. 635–642, 2009.

MEAD, R. A.; EROSCHENKO, V. P.; HIGHFILL, D. R. Effects of progesterone and estrogen on the histology of the oviduct of the garter snake, *Thamnophis elegans*. **General and Comparative Endocrinology**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 345–354, 1981.

MELGAREJO, A. R. ; CUNHA, A. C. M. ; AGUIAR, A. S. . Reprodução de *Lachesis muta rhombata* WIED, 1824 (SERPENTES: VIPERIDAE). In: V Congresso Latinoamericano de Herpetologia, 1999, Montevideú. **Resumos** [...]. Montevideú, 1999.

MUNIZ-DA-SILVA, D. F. **Reprodução em crotalíneos: Uterine Muscular Twisting in vivo**. 2016. 76p. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

MUNIZ-DA-SILVA, D. F. et al. Caudal oviduct coiling in a viperid snake, *Crotalus durissus*. **Acta Zoologica**, [s. l.], n. July, p. 1–9, 2018.

NILSON, G.; ANDRÉN, C. Function of renal sex secretion and male hierarchy in the adder, *Vipera berus*, during reproduction. **Hormones and Behavior**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 404–413, 1982.

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

RIPA, D. Keys to understanding the bushmasters (genus *Lachesis* Daudin, 1803). **Bulletin of the Chicago Herpetological Society**, v. 34, n. 3, p. 45-92, 1999.

RIPA, D. **The Bushmasters: Morphology in evolution and behavior**. [s.l: s.n.]. v. 2. 2002.

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**, [s. l.], v. 274, n. 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**, [s. l.], v. 134, n. 4, p. 577–586, 2015.

ROJAS, C. A.; BARROS, V.A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. A histological and ultrastructural investigation of the female reproductive system of the water snake (*Erythrolamprus miliaris*): Oviductal cycle and sperm storage. **Acta Zoologica**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 69–80, 2019.

SCHUETT, G. W. Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers? In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE, E. D. **Biology of the Pitvipers**. Tyler: Selva, 1992. p. 169–184.

SEVER, D. M.; HAMLETT, W. C. Female sperm storage in reptiles. **Journal of Experimental Zoology**, [s. l.], v. 292, n. 2, p. 187–199, 2002.

SEVER, D. M.; RYAN, T. J. Ultrastructure of the Reproductive System of the Black Swamp Snake (*Seminatrix pygaea*): Part I. Evidence for Oviducal Sperm Storage. **Journal of Morphology**, [s. l.], v. 241, n. 1, p. 1–18, 1999. Disponível em: [http://www2.selu.edu/Academics/Faculty/dsever/Sever 1999 Seminatrix I.pdf](http://www2.selu.edu/Academics/Faculty/dsever/Sever%201999%20Seminatrix%20I.pdf). Acesso em: 14 jan. 2019.

SIEGEL, D.S.; SEVER, D. M. Utero-muscular twisting and sperm storage in viperids. **Herpetological Conservation and Biology**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 87–92, 2006. Disponível em: http://www2.selu.edu/Academics/Faculty/dsever/Siegel_Sever_2006.pdf. Acesso em: 14 jan. 2019.

SIEGEL, Dustin S.; SEVER, D. M. Sperm Aggregations in Female *Agkistrodon piscivorus* (Reptilia: Squamata): A Histological and Ultrastructural Investigation. **Journal of Morphology**, [s. l.], v. 269, n. October, p. 189–206, 2008.

SIEGEL, D. S.; MIRALLES, A.; CHABARRIA, R. E.; Aldridge, R. D. Female reproductive anatomy: cloaca, oviduct, and sperm storage. In: ALDRIDGE, R.; SEVER, D. M. **Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes**. [s.l.]: CRC Press, 2011. cap.9, p. 347–410.

SILVA, K. M. P. et al. Reproductive Biology of *Bothrops atrox* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) from the Brazilian Amazon. **Herpetologica**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 198, 2019a.

SILVA, K. M. P. et al. Infundibular sperm storage and uterine muscular twisting in the Amazonian lancehead, *Bothrops atrox*. **Anatomical Record**, [s. l.], n. March, p. 1–10, 2019b.

VIAL, J. L.; JIMENEZ-PORRAS, J.M. The Ecogeography of the Bushmaster, *Lachesis muta*, in Central America. **American Midland Naturalist**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 182, 1967.

YAMANOUYE, N. et al. Reproductive cycle of the Neotropical *Crotalus durissus terrificus*: II. Establishment and maintenance of the uterine muscular twisting, a strategy for long-term sperm storage. **General and Comparative Endocrinology**, [s. l.], v. 139, n. 2, p. 151–157, 2004.

ZAR, J. H. **Biostatística analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 663 p.