Biologia reprodutiva da cobra coral
verdadeira *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus,
1758) (SQUAMATA: ELAPIDAE)

Fonte: Antoine Fouquet

Rafaela Zani Coeti

RAFAELA ZANI COETI

**Biologia reprodutiva da cobra coral verdadeira *Micrurus
lemniscatus* (Linnaeus, 1758) (SQUAMATA: ELAPIDAE)**

São Paulo
2016

RAFAELA ZANI COETI

**Biologia reprodutiva da cobra coral verdadeira *Micrurus lemniscatus*
(Linnaeus, 1758) (SQUAMATA: ELAPIDAE)**

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Selma Maria de Almeida Santos

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3343
FMVZ

Coeti, Rafaela Zani
Biologia reprodutiva da cobra coral verdadeira *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758)
(SQUAMATA: ELAPIDAE) / Rafaela Zani Coeti. -- 2016.
98 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

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

1. Elapidae. 2. *Micrurus*. 3. Reprodução. 4. Estocagem de esperma. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "ESTRATÉGIAS REPRODUTIVAS DE *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758) (SQUAMATA: ELAPIDAE) DO BRASIL", protocolado sob o CEUA nº 2445160714, sob a responsabilidade de **Selma Maria de Almeida Santos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/06/2016.

We certify that the proposal "REPRODUCTIVE STRATEGIES OF *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758) (Squamata: Elapidae) OF BRAZIL", utilizing 100 Reptiles (males and females), protocol number CEUA 2445160714, under the responsibility of **Selma Maria de Almeida Santos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/15/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [07/2014](#) a [07/2016](#)

Área: [Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres](#)

Procedência: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Répteis](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [0 a 10 anos](#)

N: [100](#)

Linhagem: [Micrurus lemniscatus](#)

Peso: [0 a 100 kg](#)

Resumo: Este estudo pretende analisar e descrever o ciclo reprodutivo de machos e fêmeas da espécie *Micrurus lemniscatus* de todo o Brasil.

A descrição do ciclo reprodutivo dessa espécie proporcionará maiores conhecimentos sobre a espécie, podendo ajudar em futuras pesquisas sobre sua história de vida, distribuição, filogenia e a evitar que ocorram mais acidentes ofídicos com esta espécie altamente venenosa. Além disso, o estudo de indivíduos provindos de coleções zoológicas evita não só a coleta no ambiente destes, como também pode fornecer dados que ajudem no seu manejo e conservação.

Local do experimento: Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional da FMVZ-USP Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan

São Paulo, 15 de junho de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: COETI, Rafaela Zani

Título: **Biologia reprodutiva da cobra coral verdadeira *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758) (SQUAMATA: ELAPIDAE)**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Aos Zani, aos Coeti e também aos Pereira de Mello
pelo sangue que nessas veias corre
e por todo amor e carinho nesta caminhada...*

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo auxílio financeiro e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo bem como o Programa de Pós Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres por terem possibilitado este trabalho.

Aos curadores, ajudantes e respectivas coleções que cederam os espécimes para a realização do meu mestrado: Giselle Agostini Cotta e Flávia Cappuccio de Resende; Fundação Ezequiel Dias, Minas Gerais. Paulo Garcia e Samuel Campos Gomides; Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Minas Gerais. Luciana Barreto Nascimento; Museu de Ciências Naturais da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Paulo Roberto Manzani e Karina Rebelo; Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas. Giuseppe Puerto e Valdir Germano, Coleção Herpetológica do Instituto Butantan, São Paulo. Gustavo Graciolli e Thomaz Sinani; Coleção Zoológica da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Felipe Franco Cursio; Coleção de Vertebrados, Mato Grosso. Jucivaldo Dias Lima; Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá. Moisés Barbosa de Souza; Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Acre. Hipócrates Chalkidis; Laboratório de Pesquisas Zoológicas das Faculdades Integradas do Tapajós, Pará. Richard Vogt; Coleção Herpetológica de Anfíbios e Répteis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Mariluce Rezende Messias; Coleção de Referência da Herpetofauna de Rondônia. Ana Lúcia Prudente e João Fabricio de Melo Sarmiento; Museu Paraense Emílio Goeldi, Pará. Maria Rita Silvério Pires; Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Ouro Preto. Renato Feio; Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa. Hussan Zaher; Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

À minha orientadora, Selma Maria de Almeida-Santos, por acreditar em mim e no meu trabalho e por esses dois anos de aprendizado não só profissional como pessoal. Obrigada Selma por todas as conversas, conselhos e puxões de orelha, você me inspira todos os dias.

Ao professor Otávio A. V. Marques por todas as dúvidas que me tirou e pela paciência quando eu perguntava: professor, tem cinco minutinhos?

Aos outros pesquisadores do Laboratório de Ecologia e Evolução, professoras Maria José de J. Silva e Nancy Oguiura pela solicitude, professor Hebert Ferrarezzi pelas discussões sobre a filogenia das *Micrurus* e professor Rogério Bertani pela ajuda e futura colaboração.

Aos funcionários e colegas do Laboratório de Ecologia e Evolução por toda a disponibilidade e ajuda ao longo do meu mestrado.

Aos colegas do Grupo de Reprodução em Squamata, Letícia Ruiz Sueiro, pela primeira inspiração, conselhos e colaboração em cursos, Henrique Braz, Karina Kasperoviczus, Livia Cristina dos Santos, Cláudio Augusto Rojas e Verônica Alberto Barros pela troca de experiências, ensinamentos e ajuda sempre que precisei. Aos colegas Igor Federsoni, Antônio Bordignon, Diego Muniz-da-Silva, Miguel Lobo, Poliana Garcia Correa, Ingrid Stein, Juliana Passos, Serena Migliore e Fernanda Magno pela convivência e troca diária de experiências e em especial ao Erick Augusto Bassi pelas discussões e sugestões, à Patrícia Marinho pelas conversas e incentivo, à Kalena Barros pela parceria em todos os projetos (não só acadêmicos) e à Karina Maria Pereira da Silva por todo o cuidado que teve comigo, por todas as coisas que me ensinou e pela amizade. Obrigada a todos vocês por dividirem um pouco da vida de vocês comigo.

Ao Rafael Bovo que me incentivou a procurar a Selma e foi o culpado pela minha introdução no mundo herpetológico.

À Santa Ophidia por colocar o Alexandre Missassi no meu caminho, obrigada pelos mapas e pela colaboração Xandão!

Ao Valdir Germano por todas as vezes que me ajudou na identificação das *Micrurus* e por me ensinar a contar as escamas e correr as chaves taxonômicas.

Aos pesquisadores do Museu Biológico, Giuseppe Puerto e Silvia Regina Tavaglia Cardoso pelas recentes colaborações e ensinamentos.

Aos pesquisadores da Biologia Celular do Instituto Butantan, professor Carlos Jared e professora Marta Antoniazzi por me acolherem no laboratório e permitirem a realização de técnicas histológicas e fotos e em especial à Simone Jared e professora Marta pela atenção inestimável. Aos colegas da Biologia Celular pelas conversas, troca de experiências e risadas.

Ao professor Paulo Passos pelas sugestões e discussões sobre as *Micrurus* “lemnibocas”.

Ao Ivan Nery Cardoso pela ajuda com o inglês deste trabalho e de muitos outros.

Ao Ronaldo Agostinho da Silva pelo auxílio técnico na fabricação de todas as lâminas histológicas utilizadas neste trabalho.

Ao Amilton César dos Santos por todas as vezes que me ajudou e por me auxiliar sempre com as fotos das lâminas histológicas.

À Marcélia Bastos por me receber na sua casa em Belém quando precisei analisar os exemplares da coleção do MPEG e ao Paulo Machado por nos apresentar e proporcionar essa amizade.

Ao Vinícius Gasparotto pelo registro de uma fêmea grávida de *M. l. carvalhoi* que acabou sendo a única deste trabalho.

A todas as pessoas que me ajudaram com vídeos e fotos para compor este e outros trabalhos com as *Micrurus*.

Agradeço aos professores Alberto Peret, Evelise Fragoso e amiga Tatiane Ferraz Luiz por me incentivarem sempre, pela base científica desenvolvida e pela amizade.

Aos amigos queridos que estão sempre comigo, não importa a distância física: Bernardo, Daniel, Pedro, Fábio, Panda, Vinícius, Flávia, Tabata, Helena, Tete, Rachel, Marina, Maura e Juliana. Vocês sabem o quanto amo cada um de vocês.

Ao Dani e a Flá pelas imagens para a minha dissertação.

As minhas primas queridas Anai, Marina e Mariana e à tia Lu que estão sempre me dando suporte para enfrentar a vida paulistana. Ao meu primo Germano por todo carinho e amizade.

Às minhas queridas companheiras de casa, Isís, Jenifer e Aline, por dividirem seus dias comigo. Obrigada por serem minha família aqui nesta cidade grande e fazerem os dias serem menos solitários.

Por fim, porém não menos importante, agradeço à minha família e aos meus pais por acreditarem em mim, viverem esse sonho junto comigo e por todo o suporte e incentivo. Pai, mãe, eu juro que um dia eu vou ter um emprego!

Obrigada a todos que de alguma forma fizeram e fazem diferença na minha vida!

“Quando você elimina o impossível, o que restar, não importa o quão improvável, deve ser a verdade” Sherlock Holmes.

RESUMO

COETI, R. Z. **Biologia reprodutiva da cobra coral verdadeira *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758) (SQUAMATA: ELAPIDAE).** [Reproductive biology of the coral snake *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758) (SQUAMATA: ELAPIDAE)]. 2016. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Recentes estudos do gênero *Micrurus*, o qual é popularmente conhecido como o das “cobras-corais verdadeiras”, dividem este táxon em dois grupos morfológicamente distintos, o grupo das cobras corais com anéis negros em mônades (BRM) e o grupo das cobras corais com anéis negros em tríades (BRT) e, com base na morfologia macroscópica, supõe-se que esses grupos possuam estratégias reprodutivas diferenciadas. Assim, este estudo analisa e descreve a biologia reprodutiva de machos e fêmeas da espécie de serpente de tríades *Micrurus lemniscatus* de algumas regiões do Brasil. *Micrurus lemniscatus* é um complexo, com evidências polifiléticas, sendo composto por quatro subespécies: *Micrurus l. carvalhoi*, *Micrurus l. helleri*, *Micrurus l. diutius* e *M. l. lemniscatus* que habitam Mata atlântica, Cerrado e Floresta Amazônica brasileiros. Para isto foram utilizados animais preservados em coleções herpetológicas, dos quais obtiveram-se dados biométricos e merísticos. Além disso, estes espécimes foram dissecados e suas gônadas medidas e coletadas para análises morfológicas e histológicas. Outras características, relacionadas à biologia reprodutiva, como presença de dimorfismo sexual, morfologia macro e microscópica, diferenciação das gônadas durante as estações e estocagem de espermatozoides também foram estudadas. O ciclo reprodutivo de *Micrurus lemniscatus carvalhoi* da Mata Atlântica e Cerrado foi estudado separadamente do ciclo reprodutivo de *Micrurus lemniscatus lemniscatus* da Amazônia e a comparação entre eles evidencia diferenças consideráveis, assim, é provável que o habitat esteja influenciando o ciclo dessas subespécies, o que pode gerar uma barreira reprodutiva e futura especiação entre elas.

Palavras-chave: Elapidae. *Micrurus*. Reprodução. Estocagem de esperma.

ABSTRACT

COETI, R. Z. **Reproductive biology of the coral snake *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758) (SQUAMATA: ELAPIDAE)**. [Biologia reprodutiva da cobra coral verdadeira *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758) (SQUAMATA: ELAPIDAE)]. 2016. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Recent studies about the genus *Micrurus*, popularly known as “true coral snakes”, divide this taxon in two morphologically distinct groups: the group which has black rings arranged in monads (BRM) and the group which has black rings in triads (BRT) and, based on macroscopic morphology, it is assumed that these groups have different reproductive strategies. Therefore, this research analyzes and describes male and female *Micrurus lemniscatus* reproductive biology of some regions in Brazil. *M. lemniscatus* is a species complex with polyphyletic evidence, consisting of four subspecies: *Micrurus l. carvalhoi*, *Micrurus l. helleri*, *Micrurus l. diutius* and *M. l. lemniscatus*, which inhabit the Atlantic rainforest, Cerrado and Amazon rainforest. For such, animals of herpetological collections were used to obtain biometric and meristic data. In addition, these specimens were dissected and their gonads measured and collected for morphological and histological analyzes. Other features related to reproductive biology were examined, such as the presence of sexual dimorphism, macroscopic and microscopic morphology, gonadal differentiation during the seasons, and sperm storage. The reproductive cycle of *Micrurus lemniscatus carvalhoi* from Atlantic forest and Cerrado was studied separately from the reproductive cycle of *Micrurus lemniscatus lemniscatus* from the Amazon forest and the comparison between them shows considerably differences, so it is likely that the habitat is influencing the cycle of these subspecies, which can generate a reproductive barrier and future speciation between them.

Keywords: Elapidae. *Micrurus*. Reproduction. Sperm storage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica dos espécimes de <i>Micrurus lemniscatus carvalhoi</i> analisados.....	25
Figura 2 - Exemplificação de como foram feitas as medidas microscópicas em machos e fêmeas	30
Figura 3 - Variação dos CRCs de fêmeas e machos ao longo do ano e atividade sazonal.....	32
Figura 4 - Cortes histológicos transversais dos menores macho e fêmea maduros	33
Figura 5 - Sistema urogenital masculino de <i>M. l. carvalhoi</i>	34
Figura 6 - Variação dos testículos e túbulos seminíferos durante o ano	36
Figura 7 - Cortes histológicos transversais e longitudinais de testículos de <i>M. l. carvalhoi</i> em diferentes estações	37
Figura 8 - Variação dos rins e segmentos sexuais renais durante o ano	39
Figura 9 - Cortes histológicos transversais e longitudinais de rim de <i>M. l. carvalhoi</i> em diferentes estações	40
Figura 10 - Variação dos ductos deferentes durante o ano	42
Figura 11 - Cortes histológicos transversais e longitudinais de ductos deferentes de <i>M. l. carvalhoi</i> em diferentes estações	43
Figura 12 - Machos de <i>M. l. carvalhoi</i> em comportamento de combate	44
Figura 13 - Sistema urogenital feminino de <i>M. l. carvalhoi</i>	45
Figura 14 - Dispersão dos folículos de <i>M. l. carvalhoi</i>	46
Figura 15 - Tendências para a variação epitelial e do tecido conjuntivo nas estações.....	46
Figura 16 - Cortes transversais e longitudinais da vagina de <i>M. l. carvalhoi</i> em diferentes estações	47
Figura 17 - Cortes transversais e longitudinais do infundíbulo de <i>M. l. carvalhoi</i> em diferentes estações	48
Figura 18 - Cortes longitudinais de Infundíbulo posterior e anterior de <i>M. l. carvalhoi</i>	49

Figura 19 - Resumo das estratégias reprodutivas encontradas nas fêmeas e machos de <i>M. l. carvalhoi</i>	49
Figura 20 - Distribuição geográfica dos espécimes de <i>Micrurus lemniscatus helleri</i> , <i>Micrurus lemniscatus lemniscatus</i> e <i>Micrurus lemniscatus diutius</i> analisados.....	63
Figura 21 - Variação dos CRCs de fêmeas e machos ao longo do ano e atividade sazonal.....	69
Figura 22 - Cortes histológicos transversais dos menores machos maduros de <i>Micrurus lemniscatus lemniscatus</i> e <i>Micrurus lemniscatus diutius</i>	72
Figura 23 - Sistema urogenital masculino de <i>M. l. lemniscatus</i> e <i>M. l. diutius</i>	73
Figura 24 - Variação do epitélio e diâmetro dos túbulos seminíferos de <i>M. l. lemniscatus</i> durante o ano	74
Figura 25 - Variação do comprimento e diâmetro dos rins e do epitélio e diâmetro dos segmentos sexuais renais de <i>M. l. lemniscatus</i> durante o ano	75
Figura 26 - Variação do diâmetro e variações médias do epitélio e diâmetro dos ductos deferentes de <i>M. l. lemniscatus</i> durante o ano	76
Figura 27 - Cortes histológicos de testículos, rins e ductos deferentes de <i>M. l. lemniscatus</i>	78
Figura 28 - Cortes histológicos de testículos, rins e ductos deferentes de <i>M. l. diutius</i>	80
Figura 29 - Transição do sistema urogenital feminino de <i>M. l. lemniscatus</i> e <i>M. l. diutius</i>	81
Figura 30 - Gráfico de dispersão dos folículos de <i>M. l. lemniscatus</i> e <i>M. l. diutius</i>	83
Figura 31 - Crescimento epitelial e do tecido conjuntivo em fêmeas de <i>M. l. lemniscatus</i>	85
Figura 32 - Cortes histológicos de vagina e infundíbulo posterior de <i>M. l. lemniscatus</i>	86
Figura 33 - Cortes histológicos de vagina e infundíbulo posterior de <i>M. l. diutius</i>	87
Figura 34 - Padrões de estocagem em fêmeas amazônicas de <i>M. l. diutius</i> e <i>M. l. lemniscatus</i>	88
Figura 35 - Cortes de folículos de <i>Micrurus</i> da Amazônia	89

Figura 36 - Resumo de estratégias reprodutivas encontradas nas fêmeas e machos de <i>M. lemniscatus</i> da Amazônia	90
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Lista de regiões e coleções científicas consultadas	26
Quadro 2 - Lista de regiões e coleções científicas consultadas	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características que definem as subespécies de <i>Micrurus lemniscatus</i>	26
Tabela 2 - Dados morfológicos dos machos e fêmeas de <i>Micrurus lemniscatus carvalhoi</i>	31
Tabela 3 - Características que definem as subespécies de <i>Micrurus lemniscatus</i>	62
Tabela 4 - Dados morfológicos dos machos e fêmeas de <i>Micrurus lemniscatus lemniscatus</i>	70
Tabela 5 - Dados morfológicos dos machos e fêmeas de <i>Micrurus lemniscatus diutius</i>	71
Tabela 6 - Dados estatísticos dos machos de <i>Micrurus lemniscatus lemniscatus</i>	74
Tabela 7 - Medidas e aspecto dos folículos das <i>Micrurus</i> amazônicas.....	89

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2	BIOLOGIA REPRODUTIVA DE <i>MICRURUS LEMNISCATUS</i>	
	DA MATA ATLÂNTICA E CERRADO	22
2.1	INTRODUÇÃO.....	22
2.2	MATERIAL E MÉTODO.....	24
2.3	RESULTADOS	31
2.3.1	Dimorfismo e maturidade sexual	31
2.3.2	Biologia reprodutiva dos machos	34
2.3.3	Comportamento de Combate	44
2.3.4	Biologia reprodutiva das fêmeas	44
2.4	DISCUSSÃO	50
2.5	CONCLUSÕES.....	53
	REFERÊNCIAS	54
3	BIOLOGIA REPRODUTIVA DE <i>MICRURUS LEMNISCATUS</i>	
	DA AMAZÔNIA	60
3.1	INTRODUÇÃO.....	60
3.2	MATERIAL E MÉTODO.....	61
3.3	RESULTADO.....	68
3.3.1	Dimorfismo e maturidade sexual	68
3.3.2	Biologia reprodutiva dos machos	72
3.3.3	Biologia reprodutiva das fêmeas	81
3.3.4	Padrões de estocagem nas fêmeas	87
3.3.5	Crescimento folicular	89
3.4	DISCUSSÃO	90
3.5	CONCLUSÕES.....	93
	REFERÊNCIAS	94
4	CONCLUSÕES GERAIS.....	98

1 INTRODUÇÃO GERAL

Nenhum organismo individual é imortal, logo a viabilidade de qualquer população biológica depende intimamente de seu sucesso reprodutivo (SHINE; BONNET, 2009).

Dentre todos os seres vivos, as serpentes são exemplos de animais surpreendentemente diversos no tempo, frequência e magnitude de seus esforços reprodutivos (GREENE, 1997), o que faz de cada população única, não sendo possível padronizar nenhuma informação a todas as espécies (SHINE; BONNET, 2009)

Os elapídeos são uma família de serpentes muito distinta, com espécies distribuindo-se desde o Sudeste e Sudoeste dos Estados Unidos, incluindo o México, até a América Central e do Sul, com muitas espécies também distribuídas pelo continente asiático, africano e na Austrália (CAMPBELL; LAMAR, 2004). Elapidae faz parte das cobras modernas superiores, Caenophidia, mas desenvolveram características únicas como as presas proteróglifas condutoras de veneno, caniculadas no maxilar frontal, e um músculo adutor dividido em porção ventral e dorsal que circula a glândula de veneno e é o único músculo encarregado da compressão desta (ROZE, 1996).

Os representantes da Família Elapidae, encontrados nas Américas (Novo Mundo), são popularmente conhecidos como “cobras-corais verdadeiras” e sua coloração coral corresponde a uma composição de anéis, bandas ou manchas alternadas, podendo ser negras (ou marrom escuras), vermelhas e brancas ou amarelas (FRANÇA, 2008). As cobras corais americanas são ovíparas, seu período de incubação varia dependendo da localidade. Os ovos são alongados e semicilíndricos e não há relatos sobre cuidado parental (ROZE, 1996).

Várias divisões em gêneros foram sugeridas ao longo dos anos para Elapidae do Novo Mundo e cerca de 123 espécies e subespécies são conhecidas (SILVA JR.; SITES, 2001; PIRES et al., 2014), podendo ser divididas em três gêneros: *Micrurus*, *Leptomicrurus* e *Micruroides* (SLOWINSKI, 1995).

As serpentes do gênero *Micrurus* apresentam características como olhos pequenos e cauda curta, que permitem reconhecê-las como subterrâneas ou fossórias, caçando e abrigando-se geralmente sob a superfície, dentro da terra ou

sob a serapilheira (MARQUES; SAZIMA, 2004) o que dificulta seu estudo e visualização no ambiente (ROZE, 1996).

Estudos de corais em cativeiro também são raros, pois são serpentes fisiologicamente sensíveis, de difícil alimentação por não aceitarem mamíferos ou roedores como alimento e, portanto, de difícil manutenção (OLIVEIRA et al., 2005). Por conta disto os dados mais precisos sobre sua história natural e reprodução tem sido obtidos mais facilmente pelo estudo de espécimes fixadas e tombadas em coleções zoológicas (MARQUES, 1992).

O gênero *Micrurus*, segundo Slowinski (1995), estaria dividido em grandes clados. Um dos grupos integrantes seria formado pelas espécies sul-americanas que possuem coloração em tríades, a exemplo de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus*. Este grupo teria como característica monofilética um hemipênis levemente bilobado e comparativamente curto. Ainda em seu estudo, Slowinski (1995) também sugere um outro clado, tendo como caracteres monofiléticos coloração em mônade e tamanho caudal geralmente maior que 10% do tamanho total do animal. Neste grupo estariam espécies como *M. coralinnus*, *M. fulvius* e *M. nigrocinctus*. Estudos posteriores como os de Serafim, Peccinini-Seale e Batistic (2007); Marques, Pizzato e Almeida-Santos (2013) e Pires et al. (2014) utilizam das siglas BRT (“black ring triads”) e BRM (“black ring monads”) para referir-se, respectivamente, a estes clados.

A linhagem das serpentes corais (BRT e BRM) pode estar ligada a estratégias reprodutivas diferentes. Segundo Marques, Pizzato e Almeida-Santos (2013), as serpentes pertencentes a linhagem de tríades (BRT) tendem a um dimorfismo sexual, onde os machos são geralmente maiores que as fêmeas. Além disso, o índice SSD (índice de dimorfismo sexual) negativo encontrado sugere a possibilidade de haver comportamento de combate nesta linhagem, observado por Almeida-Santos, Schidmit e Balestrin (1998) em *M. frontalis altirostris*.

Micrurus lemniscatus (Linnaeus, 1758) é uma serpente que apresenta o padrão de coloração em tríades (BRT), ou seja, com três anéis negros, intercalados por dois anéis brancos e dois anéis vermelhos mais externos. O focinho é preto seguido por uma banda branca, uma banda preta que cobre a escama frontal e finalmente uma banda vermelha parietal que cobre várias dorsais. É considerada uma espécie de grande porte com a maioria dos adultos medindo entre 500 e 900

mm e o maior espécime já estudado medindo 1390 mm. (ROZE, 1996; CAMPBELL; LAMAR, 2004).

A espécie em estudo possui ampla distribuição e está presente na maior parte da América Latina, a citar: Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Peru, Argentina e Venezuela. No Brasil, ocorre em todos os ecossistemas, com exceção do Pantanal (PIRES, 2011).

Segundo Silva Jr. e Sites (2001), *M. lemniscatus* deve ser considerado um complexo, com evidências polifiléticas. Sua ampla distribuição pela América Latina dificulta a interpretação de suas vertentes, demonstrando que ainda há necessidade de uma revisão dos táxons que compõem o grupo. Campbell e Lamar (2004) consideram existentes 4 subespécies no complexo *Micrurus lemniscatus*, a citar: *Micrurus l. carvalhoi*, *Micrurus l. helleri*, *Micrurus l. diutius* e *M. l. lemniscatus*.

O estudo de aspectos reprodutivos de *Micrurus lemniscatus* de regiões brasileiras, por meio de análises histológicas e morfológicas das gônadas e vias genitais pode elucidar os processos vitelogênicos e espermatogênicos do ciclo de cada subespécie. Além disso, estes dados reprodutivos podem também ajudar na obtenção de maiores informações sobre a caracterização climática, distribuição geográfica, taxonomia e sistemática da espécie em estudo (ALMEIDA-SANTOS; PIZZATTO; MARQUES, 2006).

CAPÍTULO 1: Biologia Reprodutiva de *Micrurus lemniscatus* da Mata Atlântica e Cerrado

2 BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *MICRURUS LEMNISCATUS* DA MATA ATLÂNTICA E CERRADO

2.1 INTRODUÇÃO

Estudos reprodutivos em serpentes na América do Sul são encorajados pela grande diversidade de espécies existentes, algumas ameaçadas de extinção (ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2013; SILVA; SUEIRO; GALASSI et al., 2014; SILVA; ZOGNO; CAMILLO et al., 2015; BRAZ; SCARTOZZONI; ALMEIDA-SANTOS, 2016), entretanto poucos deles foram destinados às *Micrurus* brasileiras (PIZZATO; MARQUES; ALMEIDA-SANTOS, 2013).

Alguns parâmetros são comumente considerados em estudos reprodutivos de serpentes: para as fêmeas considera-se a vitelogênese, processo onde os folículos passam por transformações e deposição de vitelo, ocorrendo da vitelogênese primária (quiescência folicular) até a secundária (fase ativa e depósito de vitelo nos folículos) (ALDRIDGE, 1979). Para os machos, deve-se considerar o aumento do comprimento/massa que ocorre nos testículos durante a espermatogênese (SCHUETT et al., 2002; KROHMER; MARTINEZ; MASON, 2004) e a presença ou não de espermatozoides no ducto deferente, utilizada para verificar o status de maturidade sexual (SHINE, 1977).

Além destes, outros parâmetros foram estabelecidos com o uso da microscopia e análises histológicas, como a observação da hipertrofia do segmento sexual renal (SSR), porção especializada do néfron, formado por um epitélio simples, constituído de células colunares com núcleo basal e presença de grânulos de secreção espalhados por todo o citoplasma (SEVER et al., 2002; KROHMER; MARTINEZ; MASON, 2004). O segmento sexual renal está associado com o hormônio testosterona, sendo uma estrutura andrógeno-dependente (SCHUETT et al., 2002; KROMER; MARTINEZ; MASON, 2004).

Outro parâmetro a ser observado é a estocagem de espermatozoides no trato reprodutivo feminino, que pode ocorrer em diferentes regiões dependendo da serpente, sendo já descritas as estocagens no útero posterior (UMT = uterine muscular twisting) e infundíbulo posterior para viperídeos (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; SIEGEL; SEVER, 2006) e no infundíbulo posterior e junção útero-vaginal para colubrídeos (BAUMAN; METTER, 1977; ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2015).

A observação de todos estes parâmetros permite que o ciclo reprodutivo das espécies seja então classificado. A classificação mais atual utilizada para o estudo da reprodução em serpentes (MATHIES, 2011) separa os ciclos a nível individual e populacional. O ciclo de um indivíduo pode apresentar regressão total das gônadas em algum período do ano (descontínuo cíclico), apresentar uma regressão somente parcial destas (contínuo cíclico) ou não apresentar regressão em nenhum período (acíclico). Já quando se classifica a população, acrescenta-se o nível de sincronia entre machos e fêmeas, podendo esta ocorrer entre eles (sincrônico), ou acontecer, mas não de uma forma marcadamente fechada (semi-sincrônico) ou não ocorrer nenhuma sincronia (assazonal).

Micrurus lemniscatus carvalhoi (ROZE, 1967) possui ampla distribuição no Brasil, ocupando sua parte central e leste e mostrando grande variação em sua cor e características merísticas de acordo com a região que habita (PIRES; SILVA JR.; FEITOSA et al., 2014), preferindo planícies de floresta secas ou florestas úmidas, marginalmente ao cerrado (ROZE, 1996).

A base de sua dieta são animais serpentiformes e itens como peixes alongados, (*Synbranchus masmoratus*, *Gymnotus* sp), serpentes (*Sibynomorphus mikanii*) e anfisbenas (*Amphisbaena roberti*) já foram encontrados em seu trato digestivo (ROZE, 1996).

Os poucos estudos existentes sobre seu ciclo reprodutivo, realizados principalmente por Marques, Almeida-Santos e Rodrigues (2006) e Marques, Pizzatto e Almeida-Santos (2013) baseados em medidas macroscópicas, sugerem que o início da vitelogênese secundária é durante o outono, podendo progredir até a primavera onde ocorreria a ovulação, oviposição e eclosão dos ovos entre o verão e o outono. Para os machos desta subespécie, a medida dos testículos e a variação do seu tamanho são maiores durante o verão e declinam gradualmente até o inverno, o que poderia indicar um pico de produção espermática no verão.

No entanto, estudos atuais como (MATHIES, 2011; ALMEIDA-SANTOS et al., 2014) sugerem que para uma melhor caracterização do ciclo reprodutivo, são necessárias também análises microscópicas que podem evidenciar a atividade celular dos túbulos seminíferos e o espessamento de epitélios nas fêmeas. Além disso, ressalta-se a importância do exame histológico no fornecimento de novas informações, mesmo quando a amostra é pequena (CHAN, 2003; GRIBBINS; RHEUBERT; POLDEMANN, 2009; MATHIES, 2011).

Sendo assim, este estudo, discorre sobre os aspectos reprodutivos de *Micrurus lemniscatus carvalhoi*, por meio de análises histológicas e morfológicas das gônadas e vias genitais, tendo como objetivo elucidar os processos vitelogênicos e espermatogênicos do ciclo dessa subespécie bem como evidenciar presença ou não de dimorfismo sexual e estocagem de espermatozoides.

2.2 MATERIAL E MÉTODO

Neste trabalho foram examinados 57 exemplares de *Micrurus lemniscatus carvalhoi*, sendo 41 machos e 16 fêmeas, provenientes da Mata Atlântica e Cerrado (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição geográfica dos espécimes de *Micrurus lemniscatus carvalhoi* analisados

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: ○= ocorrências de *Micrurus lemniscatus carvalhoi*.

Estes espécimes estão preservados em coleções científicas do Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, citados na quadro 1.

Quadro 1 - Lista de regiões e coleções científicas consultadas

Região	Coleção científica	Sigla
Centro-Oeste	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul	UFMS
Sudeste	Fundação Ezequiel Dias Universidade Federal de Minas Gerais Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais Instituto Butantan Museu de História Natural da Universidade Estadual de Campinas Universidade Federal de Viçosa Universidade Federal de Ouro Preto Museu de Zoologia da USP	FUNED UFMG PUC-MG IB ZUEC UFV UFOP MZUSP

Fonte: (COETI, 2016).

Inicialmente, todos os indivíduos de *M. lemniscatus carvalhoi*, tiveram sua procedência e data de coleta registradas. Subsequentemente foram tomados dados merísticos segundo DOWLING (1951) (contagem das escamas ventrais e subcaudais de cada um dos espécimes), contagem das tríades (três anéis negros em sequência) e verificação sexual para separá-los em subespécies, quando necessário, de acordo com a Tabela 1. Estes dados foram utilizados para compor as análises biogeográficas com o uso do programa QGIS para a montagem do mapa de distribuição (Figura 1).

Tabela 1 - Características que definem as subespécies de *Micrurus lemniscatus*

Subespécie	Número de ventrais	Número de subcaudais	Número de tríades	Estados do Brasil
<i>carvalhoi</i>	M 224-263 F 222-267	M 25-39 F 26-38	M 10-15 F 9-16	PR, SP, MG, MT, BA, RN
<i>helleri</i>	M 230-248 F 240-260	M 33-41 F 34-43	M 9-11 F 8-11	AM, AC, RO
<i>diutius</i>	M 212-225 F 225-242	M 31-38 F 31-37	M 7-11 F 8-11	AM, AP
<i>lemniscatus</i>	M 235-246 F 242-264	M 36-40 F 31-39	M 12-15 F 11-14	PA, MA

Fonte: (ROZE, 1996; CAMPBELL; LAMAR, 2004; PIRES; SILVA JR.; FEITOSA, et al., 2014).

Legenda: M= machos, F= fêmeas, PR=Paraná, SP = São Paulo, MG = Minas Gerais, MT= Mato Grosso, BA = Bahia, RN = Rio Grande do Norte, AM = Amazonas, AC = Acre, RO = Rondônia, AP = Amapá, PA = Pará e MA = Maranhão.

Em seguida, foram coletados, com a ajuda de uma fita métrica milimetrada (mm) os seguintes dados biométricos: comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento da cauda (CC) e comprimento da cabeça (CC).

Estes dados macroscópicos foram separados de acordo com a subespécie considerada e utilizados para comparar o maior indivíduo de cada sexo, (SOLÓRZANO; CERDAS, 1988), estabelecer o histograma de atividade sazonal da amostra (MARQUES; ALMEIDA-SANTOS; RODRIGUES, 2006) e averiguar a existência de dimorfismo sexual. O dimorfismo no tamanho do corpo (CRC) foi testado por teste-t de Student (ZAR, 1999), realizado no programa *Instat*, com $P < 0,05$ como critério de significância.

Para comparações de tamanho de cauda (CC) e tamanho de cabeça (Ccab), como análises preliminares mostraram correlação destes fatores com o CRC ($r = 0,941$; $P < 0,001$; $r = 0,602$; $P < 0,001$), foram escolhidas análises de covariância (ANCOVA), de forma a eliminar o efeito do tamanho do corpo para cada variável (MARTINS et al., 2001). Desta forma, foram utilizadas como variáveis dependentes o CC e o Ccab, e como co-variável o CRC.

Para a realização de todos os testes, todas as variáveis morfológicas foram transformadas em seu logaritmo natural (ZAR, 1999).

Para comparar o dimorfismo sexual entre machos e fêmeas utilizou-se o índice utilizado por Shine (1994):

$$SSD = 1 - \left(\frac{\text{CRC médio do sexo de maior tamanho}}{\text{CRC médio do sexo de menor tamanho}} \right)$$

Onde SSD = sexual size dimorfism, ou dimorfismo do tamanho sexual, com o resultado sendo arbitrariamente definido como positivo quando as fêmeas são maiores e negativo quando os machos são maiores.

A seguir, efetuou-se uma incisão ventral ao longo do corpo dos indivíduos, tanto dos machos quanto das fêmeas, em aproximadamente dois terços do corpo, na parte caudal e a partir desta incisão, foram tomadas medidas dos órgãos sexuais de acordo com Almeida-Santos et al. (2014).

Nas fêmeas, foram registrados: o estágio folicular, podendo ser classificado em vitelogênese primária (V1) ou vitelogênese secundária (V2), o número e tamanho

de folículos ovarianos ou ovos e a presença ou não de contração muscular uterina (UMT).

Nos machos, os seguintes dados foram tomados: comprimento, largura e espessura dos testículos direito e esquerdo, largura do ducto deferente direito e esquerdo na porção caudal e comprimento e largura do rim direito.

Estes procedimentos foram registrados com fotografia digital, utilizando-se máquina fotográfica SONY DSC-W35. As estruturas anatômicas foram observadas a olho nu. Utilizou-se paquímetro digital com precisão de 0,1 mm para realizar as medidas.

Os dados referentes ao testículo determinaram o volume testicular (VT) segundo a fórmula para o volume da elipsoide (PLEGUEZUELOS; FERICHE, 1999):

$$VT = \frac{4}{3} (a.b.c),$$

Onde a= metade do comprimento do testículo, b = metade da largura do testículo, c = metade da espessura do testículo.

Assim, o volume relativo dos testículos (VT), a média da soma do diâmetro dos ductos deferentes (dDD) e o comprimento (cRim) e diâmetro (dRim) do rim foram transformados em logaritmos naturais e passaram por testes preliminares para verificar a normalidade e homogeneidade das suas variâncias com o programa Instat.

Os testes preliminares de homogeneidade descartaram os valores para diâmetro do rim, não sendo este parâmetro utilizado no trabalho. Os testes de correlação indicaram relação do CRC com o VT ($r = 0,902$; $P < 0,01$) e com o cRim ($r = 0,863$; $P < 0,01$) sendo escolhidas, portanto, análises ANCOVA como explicado anteriormente. Como o dDD varia de acordo com a produção de espermatozoides, foi descartada uma possível relação deste com o CRC, sendo utilizadas então análises de variância (ANOVA) para este parâmetro.

Após a morfometria, coletaram-se fragmentos de aproximadamente 100 mm dos espécimes adquiridos.

Nas fêmeas, foram coletados fragmentos de infundíbulo, útero, junção útero-vaginal, vagina e folículos e nos machos, foram coletados fragmentos de testículo,

ducto deferente e rim. Os fragmentos coletados foram devidamente etiquetados e conservados em álcool 70%.

Para a realização do estudo histológico, as amostras foram desidratadas em uma série crescente de etanol, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100%. As amostras ficaram submersas por 15 minutos em cada uma das concentrações e logo em seguida foram diafanizadas em Xilol I por 20 minutos e em Xilol II por mais 20 minutos.

Concomitante a diafanização, as amostras passaram por dois banhos de parafina: o primeiro overnight (12 horas) e o segundo por 6 horas. Logo após foram incluídas transversalmente ou longitudinalmente, obtendo-se blocos da amostra dentro da parafina.

Os blocos de parafina foram cortados com a ajuda de um micrótomo (Leica) em fitas de 5 µm de espessura. Essas fitas foram coladas a lâminas de vidro com uso de gelatina.

As lâminas com os cortes foram então submetidas ao processo de coloração por Hematoxilina/Eosina de acordo com Junqueira, Bignolas e Brentani (1979) e em seguida foram coladas lamínulas sobre elas, utilizando-se *permount*.

As imagens das lâminas histológicas foram capturadas por meio do fotomicroscópio Olympus BX61VS.

Essas imagens foram utilizadas, juntamente com as medidas morfométricas, para indicar o tamanho do menor macho maduro e da menor fêmea madura.

A partir destas, também foram tiradas medidas morfométricas com o auxílio do programa ImageJ version 1.46 (RASBAND, 2011).

Para os machos foram obtidas de cinco a dez medidas de cada estrutura a fim de se obter uma média. As estruturas medidas foram: o diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio seminífero nos cortes de testículo, diâmetro dos túbulos e altura do epitélio dos segmentos sexuais renais e o diâmetro e altura do epitélio dos ductos deferentes. Todas as medidas foram testadas por ANOVA.

Para as fêmeas foram obtidas medidas do epitélio da vagina e do infundíbulo posterior e do tamanho do tecido conjuntivo do infundíbulo posterior com a finalidade de quantificar a variação destas estruturas ao longo das estações. Testes estatísticos não foram aplicados neste parâmetro porque a quantidade de medidas não foi suficiente para obter-se uma amostra homogênea, sendo assim os valores foram utilizados apenas para a construção de gráficos de tendência.

Figura 2 - Exemplificação de como foram feitas as medidas microscópicas em machos e fêmeas

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Corte de rim mostrando as medidas feitas nos SSRs; B) Corte de vagina; C) Aumento do corte de vagina mostrando a medida realizada; d = diâmetro, e = epitélio.

Antes das análises estatísticas, todos os dados foram verificados quanto a sua normalidade e homogeneidade de variâncias, e diferenças significativas foram analisadas pelo teste Post-hoc de Tukey. As análises estatísticas foram feitas com ajuda dos softwares Instat e Statistica versão 7. A construção de gráficos que usaram ANCOVA foi feita a partir dos resíduos das regressões lineares entre essas variáveis e o CRC. Os resíduos foram utilizados para eliminar a influência do tamanho do corpo sobre as variáveis de interesse (MARQUES et al., 2006) e serviram apenas para ilustração dos ciclos.

Os gráficos foram elaborados nos softwares Microsoft Office Excel 2010 e Statistica 7.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Dimorfismo e maturidade sexual

As medidas de machos e fêmeas de *Micrurus lemniscatus carvalhoi* apresentaram diferenças, sendo que as fêmeas possuem maiores CRCs que os machos (Tabela 2). O histograma do CRC ao longo do ano evidencia fêmeas (Figura 3A) e machos (Figura 3B) alcançando maiores tamanhos entre o outono e o começo do inverno e a atividade sazonal da amostra (Figura 3C) atinge maior pico no outono.

Tabela 2 - Dados morfológicos dos machos e fêmeas de *Micrurus lemniscatus carvalhoi*

Variável	Média ± DP	Mínimo-Máximo	N
CRC (mm)	(M) 634,8 ± 203,9 (F) 795,6 ± 249,6	(M) 263 – 1089 (F) 362 – 1221	(M) 41 (F) 16
CC (mm)	(M) 48,7 ± 15,7 (F) 54,7 ± 16,7	(M) 18 – 85 (F) 24 – 89	(M) 41 (F) 16
Ccab (mm)	(M) 14,7 ± 4,6 (F) 17,8 ± 5,5	(M) 2 – 26 (F) 9 – 28	(M) 41 (F) 16

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: DP = desvio padrão, M = machos, F = fêmeas.

Figura 3 - Variação dos CRCs de fêmeas e machos ao longo do ano e atividade sazonal

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Comprimento rostro-cloacal das fêmeas ao longo do ano; B) Comprimento rostro-cloacal dos machos ao longo do ano; C) Atividade sazonal da amostra.

As análises estatísticas para *Micrurus lemniscatus carvalhoi* mostram dimorfismo sexual no comprimento rostro-cloacal, com tamanho significativamente maior para as fêmeas ($t = 2.983$; $gl = 54$; $P < 0.0001$). O comprimento relativo da cauda, no entanto, é maior nos machos (ANCOVA, $F_{1,53} = 6,556$; $P = 0,013$) e o comprimento da cabeça não apresenta uma diferença significativa (ANCOVA, $F_{1,53} = 0,457$; $P = 0,5$). O cálculo do índice de dimorfismo sexual (SSD) apresenta o valor de 0,29.

O observado para maturidade sexual indica que o menor macho sexualmente maduro da amostra possui 387 mm de CRC, apresentando início de atividade testicular (Figura 4A). A menor fêmea considerada madura apresentou 584 mm de CRC, seu maior folículo mediu 4,21 mm e estava em vitelogênese primária, porém o útero distendido e o infundíbulo secretor (Figura 4B) foram levados em conta para afirmar sua maturidade.

Figura 4 - Cortes histológicos transversais dos menores macho e fêmea maduros

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Corte dos túbulos seminíferos mostrando o início da atividade testicular; B) Corte de infundíbulo com secreção na luz; Sg = espermatogônias; L = luz, Se = secreção.

2.3.2 Biologia reprodutiva dos machos

Os testículos de *Micrurus lemniscatus carvalhoi* apresentam um formato oval, sendo o testículo direito mais cranial que o esquerdo e localizam-se no terço caudal da cavidade celomática, como descrito para a maioria das serpentes (Figura 5).

Figura 5 - Sistema urogenital masculino de *M. l. carvalhoi*

(Fonte: COETI, 2016).

Legenda: A) Sistema urogenital masculino, parte cranial, evidenciando Td = testículo direito, Te = testículo esquerdo, Rd = rim direito, Re = rim esquerdo; B) Sistema urogenital masculino, parte caudal, evidenciando DDd = ducto deferente direito e DDe = ducto deferente esquerdo

O volume relativo deste órgão não variou significativamente entre as estações (ANCOVA, $F_{3,34} = 0,875$, $P = 0,463$, $n = 39$, Figura 6A).

A variação para o diâmetro (ANOVA, $F_{3,15} = 1,841$; $P = 0,182$, $n = 19$) e epitélio (ANOVA, $F_{3,12} = 1,061$; $P = 0,401$, $n = 16$) dos túbulos seminíferos também não foi significativa ao longo das estações (Figura 6B e 6C).

A análise histológica evidencia espermiogênese dentro dos túbulos seminíferos durante todo o ano, a primavera apresenta uma fase de crescimento e divisão da linhagem espermatogênica (Figura 7A), a qual já possui espermatozoides no verão (Figura 7B) e apresenta aumento no número de células no outono (Figura 7C), atingindo o pico espermático no inverno (Figura 7D).

Figura 6 - Variação dos testículos e túbulos seminíferos durante o ano

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Volume relativo dos testículos; B) Comprimento médio dos epitélios seminíferos; C) Comprimento médio dos diâmetros dos túbulos seminíferos.

Figura 7 - Cortes histológicos transversais e longitudinais de testículos de *M. l. carvalhoi* em diferentes estações

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Primavera, túbulos seminíferos com linhagem espermática em crescimento; B) Verão, túbulos seminíferos em espermição; C) Outono, túbulos seminíferos com espermatozoides; D) Inverno, túbulos seminíferos em pico espermático; S = espermatozoides, Se = espermátides, Sp = espermatócitos, Sg = espermatogônias.

Os rins dos machos de *M. lemniscatus carvalhoi* são alongados e lobulados, apresentando posição mais caudal à dos testículos onde o rim direito é mais cranial que o esquerdo (Figura 5).

Em relação ao rim direito, houve diferenças significativas no comprimento (ANCOVA, $F_{3,26} = 3,382$, $P = 0,033$, $n = 36$) ao longo das estações, os testes posteriores mostraram que o comprimento no verão diferiu de todos os outros meses (teste de Tukey: $P < 0,05$ nas relações com o verão) (Figura 8A).

A variação para a média do epitélio (ANOVA, $F_{3,16} = 5,270$, $P = 0,010$, $n = 20$) e do diâmetro (ANOVA, $F_{3,22} = 8,931$; $P < 0,001$, $n = 26$) dos segmentos sexuais renais foi igualmente significativa entre as estações, com os testes posteriores para o epitélio mostrando diferenças do verão com o inverno (teste de Tukey: $P = 0,013$) e com o outono (teste de Tukey: $P = 0,048$) e para o diâmetro do inverno com as demais estações (teste de Tukey: $P < 0,05$ nas relações com o inverno) (Figura 8B e 8C).

As lâminas histológicas mostram que na primavera o SSR está hipertrofiado, quase não se observando a luz do segmento (Figura 9A), isto muda no verão onde aparentemente estão com a luz maior e com aparência de regressão (Figura 9B), já o outono aparenta um recomeço de hipertrofia (Figura 9C) que ocorre em grande quantidade ao longo de todo o corte do órgão durante o inverno (Figura 9D).

Figura 8 - Variação dos rins e segmentos sexuais renais durante o ano

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Comprimento relativo do rim direito; B) Comprimento médio dos epitélios dos segmentos sexuais renais; C) Comprimento médio dos diâmetros dos segmentos sexuais renais.

Figura 9 - Cortes histológicos transversais e longitudinais de rim de *M. l. carvalhoi* em diferentes estações

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: Segmento sexual renal (SSR) em cortes de rim, A) Primavera; B) Verão; C) Outono; D) Inverno.

Os ductos deferentes de *M. lemniscatus carvalhoi*, assim como o das serpentes no geral, ligam os testículos às papilas genitais na cloaca, posicionando-se lateralmente aos rins. Em algumas estações do ano podem estar mais enovelados, principalmente na porção mais caudal (Figura 5B).

A variação do diâmetro macroscópico dos ductos deferentes (ANOVA, $F_{3,34} = 1,696$; $P = 0,186$, $n = 39$, Figura 10A) não foi significativa entre as estações, entretanto a variação microscópica do epitélio (ANOVA, $F_{3,20} = 3,115$; $P = 0,049$, $n = 24$) e do diâmetro (ANOVA, $F_{3,20} = 4,427$; $P = 0,015$, $n = 24$) foi significativa, com testes posteriores apresentando respectivamente, diferenças entre o verão e o inverno (teste de Tukey, $P = 0,043$) e diferenças entre o inverno com a primavera e com o verão (teste de Tukey, $P = 0,035$; $P = 0,039$) (Figura 10B e 10C). Assim o inverno apresentou as maiores médias e a primavera as menores.

As análises histológicas mostram que há presença de espermatozoides na luz dos ductos ao longo de todo o ano, sendo sua quantidade menor na primavera, onde o epitélio é mais delgado (Figura 11A). No inverno o epitélio é mais espesso (Figura 11D) e no verão e outono (Figura 11B e 11C) há presença de espermatozoides alinhados ao epitélio dos ductos.

Figura 10 - Variação dos ductos deferentes durante o ano

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Diâmetro relativo dos ductos deferentes; B) Comprimento médio dos epitélios dos ductos; C) Comprimento médio dos diâmetros dos ductos.

Figura 11 - Cortes histológicos transversais e longitudinais de ductos deferentes de *M. l. carvalhoi* em diferentes estações

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: Presença de espermatozoides nos ductos, A) Primavera; B) Verão; C) Outono; D) Inverno, S = espermatozoides, seta = espermatozoides junto ao epitélio do ducto.

2.3.3 Comportamento de Combate

Os machos de *Micrurus lemniscatus carvalhoi* apresentam comportamento de combate. O registro foi feito na natureza, no dia 21 de junho de 2015, às 18:00 horas no Município de São Manuel, estado de São Paulo (22° 43' 52" S; 48° 34' 14" W) (Figura 12).

Figura 12 - Machos de *M. l. carvalhoi* em comportamento de combate

Fonte: (MISSASSI et al., no prelo)¹.

2.3.4 Biologia reprodutiva das fêmeas

As gônadas femininas apresentam assimetria, sendo o ovário direito mais cranial que o esquerdo como visto em outras serpentes.

Os folículos em vitelogênese primária (V1) de *Micrurus lemniscatus carvalhoi* possuem um formato arredondado e na amostra mediram de 1,04 mm a 6,46 mm, já os folículos em vitelogênese secundária (V2) são mais alongados e fusiformes e mediram de 11,85 mm a 39,00 mm (Figura 13).

¹ MISSASSI, A. F. R.; COETI, R. Z.; GERMANO, V. J.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. *Micrurus lemniscatus carvalhoi* (coral snake) male - male combat. Herpetological Review, 2016. No prelo.

Figura 13 - Sistema urogenital feminino de *M. l. carvalhoi*

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Ia = infundíbulo anterior, Ip = infundíbulo posterior, Ua = útero anterior; B) V1 = folículo em vitelogênese primária, V2 = folículo em vitelogênese secundária.

A distribuição dos folículos em V1 ocorre ao longo de todo o ano, enquanto os folículos em V2 aparecem no outono e inverno (Figura 14).

Fêmeas grávidas não foram amostradas, apenas o dado de uma no outono foi conseguido mediante uma foto cedida.

Figura 14 - Dispersão dos folículos de *M. l. carvalhoi*

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: Folículos em V1 = ●, Folículos em V2 = ●, Fêmeas grávidas = ■.

As fotos das lâminas histológicas mostram variação no epitélio da vagina ao longo das estações (Figura 16) confirmada pelo gráfico de tendências (Figura 15A) que mostra o crescimento contínuo do epitélio vaginal do inverno até o outono (n = 10).

Figura 15 - Tendências para a variação epitelial e do tecido conjuntivo nas estações

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Epitélio da Vagina; B) Epitélio do Infundíbulo posterior; C) Tecido Conjuntivo do Infundíbulo posterior.

Figura 16 - Cortes transversais e longitudinais da vagina de *M. l. carvalhoi* em diferentes estações

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Primavera; B) Verão; C) Outono; E) Inverno; e = epitélio, seta = bolha de secreção das células epiteliais ciliadas.

O infundíbulo também passa por modificações no decorrer das estações apresentando maior grau de invaginações do epitélio no inverno (Figura 17A) e secreções no lúmen. Na primavera o número de invaginações decresce (Figura 17B). No verão (Figura 17C) o tecido conjuntivo fica repleto de glândulas mucosas e apresenta secreções em seu lúmen. Estas glândulas desaparecem no outono (Figura 17D) onde iniciam-se novas invaginações do epitélio. O gráfico de tendências mostra o crescimento contínuo tanto do epitélio do infundíbulo posterior (n = 8, Figura 15B) quanto do tecido conjuntivo (n = 9, Figura 15C).

Figura 17 - Cortes transversais e longitudinais do infundíbulo de *M. l. carvalhoi* em diferentes estações

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Primavera com muitas invaginações do epitélio infundibular; B) Verão com formação de glândulas mucosas; C) Outono com resquícios das glândulas mucosas; D) Inverno com invaginações do epitélio e secreção no lumen; L = luz, In = invaginações, Gm = glândula mucosa, s = secreção, seta = formação das glândulas mucosas por invaginação epitelial, * = resquícios das glândulas mucosas.

Foi encontrada na amostra uma fêmea em vitelogênese primária, com espermatozoides presentes no infundíbulo posterior no outono, juntamente com alguns aglomerados de outras células em sua luz (Figura 18A). As imagens das lâminas histológicas mostram que o infundíbulo anterior possui muitas invaginações do epitélio e receptáculos ciliados já formados (Figura 18B).

Figura 18 - Cortes longitudinais de Infundíbulo posterior e anterior de *M. l. carvalhoi*

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Infundíbulo posterior com espermatozoides; B) Infundíbulo anterior com receptáculos ciliados; S = espermatozoides, se = secreção, L = luz, R = receptáculos ciliados.

Figura 19 - Resumo das estratégias reprodutivas encontradas nas fêmeas e machos de *M. l. carvalhoi*

Fonte: (PIZZATO; MARQUES; ALMEIDA-SANTOS, 2013; COETI, 2016).

Legenda: SSR = segmento sexual renal, DD = ducto deferente, * dados complementares.

2.4 DISCUSSÃO

O tamanho do corpo de fêmeas de serpentes ovíparas é uma característica importante por estar intimamente relacionada à variação no tamanho e formato dos ovos que estas serpentes podem produzir (FORD; SIEGEL, 1989) sendo, portanto, um fator que diferencia reprodutivamente as espécies. As fêmeas de *Micrurus lemniscatus carvalhoi* atingem maior comprimento (CRC) do que os machos, o que torna o índice de dimorfismo sexual (SSD) para a espécie positivo. Para espécies de elapídeos australianos o SSD positivo indica menor probabilidade de comportamento de combate entre os machos (SHINE, 1994), assim como para as *Micrurus* de tríades americanas (MARQUES; PIZZATO; ALMEIDA-SANTOS, 2013), no entanto o combate entre machos ocorre em *Micrurus lemniscatus carvalhoi* (MISSASSI et al., no prelo)². Sendo assim, a existência de combate entre machos nesta espécie, embora as fêmeas sejam maiores e o SSD positivo, corrobora a teoria de que o grupo das tríades tem esta característica como particular (MARQUES; PIZZATO; ALMEIDA-SANTOS, 2013). Por outro lado, o maior tamanho das fêmeas em relação aos machos é uma característica comumente encontrada em *Micrurus*, do grupo das mônades como *M. fulvius*, *M. corallinus* e *M. nigrocinctus* (QUINN, 1979; SOLÓRZANO; CERDAS, 1988; GOLDBERG, 2004; MARQUES; PIZZATO; ALMEIDA-SANTOS, 2013) o que pode significar que *M. l. carvalhoi* esteja filogeneticamente mais próxima a outras *Micrurus* de mônades.

Em relação à maturidade sexual, o menor macho maduro foi amostrado no verão, tendo menor tamanho que a menor fêmea madura, amostrada no outono, isto é proporcionalmente esperado para espécies em que as fêmeas atingem maiores comprimentos que os machos (QUINN, 1979; JACKSON; FRANZ, 1981; SOLÓRZANO; CERDAS, 1988; MARQUES, 1996). O menor macho maduro (387 mm) foi coletado no verão e possuiu 124 mm a mais de diferença do menor macho da amostra (263 mm), coletado na mesma estação, este dado pode servir como indicativo do crescimento relativo que os indivíduos apresentam em 12 meses (QUINN, 1979).

² MISSASSI, A. F. R.; COETI, R. Z.; GERMANO, V. J.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. *Micrurus lemniscatus carvalhoi* (coral snake) male - male combat. Herpetological Review, 2016. No prelo.

Outro parâmetro que pode ser analisado através das datas de coleta dos exemplares de museus é o padrão de atividade que estes apresentam ao longo das estações (MARQUES, 1996; MARQUES; ALMEIDA-SANTOS; RODRIGUES, 2006). A atividade sazonal para a amostra deste trabalho corrobora a atividade sazonal proposta por Marques, Almeida-Santos e Rodrigues (2006), indicando que *M. l. carvalhoi* está mais ativa durante o outono, entretanto o fato do comportamento de combate ocorrer no início do inverno pode indicar que o período de atividade seja intenso até o início dessa estação.

Variações macroscópicas na anatomia do trato reprodutivo dos machos ocorreram nos ductos deferentes, que em algumas estações estavam mais enovelados e volumosos, porém o maior volume encontrado para *M. l. carvalhoi* nesta região não se parece com o encontrado para *M. corallinus* (ALMEIDA-SANTOS; PIZZATTO; MARQUES, 2006), sugerindo que os machos de *M. l. carvalhoi* não devem estocar espermatozoides. No trato reprodutivo das fêmeas houveram variações nas pregas do infundíbulo posterior, que ocupavam uma parte maior ou menor deste de acordo com a época do ano, estas mudanças anatômicas estão ligadas à fase reprodutiva na qual o animal se encontra (SIEGEL, et al., 2014; ALMEIDA-SANTOS et al., 2014).

A falta de variação significativa ao longo do ano para o volume testicular, diâmetro e epitélio dos túbulos seminíferos condiz com o observado na histologia, o macho possui atividade espermatogênica durante todo o ano, semelhante a outros elapídeos americanos como *Micrurus nigrocinctus* (GOLDBERG, 2004) e *Micruroides euryxanthus* (GOLDBERG, 1997). Entretanto a histologia evidencia uma maior quantidade de espermatozoides na luz dos túbulos seminíferos entre o outono e o inverno, isto pode corroborar o fato dos machos apresentarem comportamento de combate no início do inverno.

Já para o comprimento do rim direito, diâmetro e epitélio do SSR houve variação significativa durante o ano, com máximas de hipertrofia no inverno e mínimas no verão, também corroboradas pela histologia. Sabe-se que a hipertrofia do SSR é coincidente à elevação de andrógenos no plasma e também ao período de maior espermatogênese em muitas espécies de serpentes (SCHUETT et al., 2002; SEVER et al., 2002; KROHMER, 2004), portanto o pico de hipertrofia do SSR no inverno está relacionado ao pico espermático em *Micrurus l. carvalhoi*.

Para os ductos deferentes, ao contrário do encontrado para outros estudos com *Micrurus* (QUINN, 1979), foi visto crescimento de diâmetro e espessamento do seu epitélio no inverno, mesma época onde ocorre o pico de produção espermática. A observação histológica também exhibe uma tendência dos espermatozoides de estarem adjacentes ao epitélio do ducto (SEVER, 2004), principalmente no verão e outono, época de pouca hipertrofia e crescimento do SSR, o qual faria a manutenção dos espermatozoides, nos ductos, através da produção de grânulos de secreção (SEVER et al., 2008). Este fato sugere que os espermatozoides no verão e outono, tendo pouca ou nenhuma secreção de natureza nutritiva para se manter, optam por procurar nutrição no epitélio do ducto, embora não haja indícios de que este epitélio seja secretório (SEVER, 2004). O contrário ocorre na primavera, nesta estação os ductos deferentes possuem valores significativamente menores do tamanho do epitélio e diâmetro, porém o SSR ainda está hipertrofiado, o que explicaria a presença de espermatozoides nos ductos ainda nesta estação.

O fato dos ductos possuírem espermatozoides durante todo o ano pode permitir que os machos dessa espécie copulem a qualquer momento, como proposto por Goldberg (2004) para *Micrurus nigrocinctus*, sendo assim o período reprodutivo de *M. l. carvalhoi* deve depender da época em que as fêmeas estão mais atrativas e receptivas, ou seja, de seu estro (JELLEN et al., 2014).

Sobre as fêmeas, os folículos medindo até 6,46 mm quando analisados não tinham formato cilíndrico e histologicamente ainda não apresentaram evidências de folículo em vitelogênese secundária (MANES et al., 2007), sendo assim é seguro considerar folículos V2 somente acima de 11,85 mm de comprimento.

O aparecimento de folículos vitelogênicos no outono e inverno, e a descoberta de espermatozoides no infundíbulo posterior de uma fêmea no início do outono indicam que as fêmeas estão em estro neste período e corrobora a atividade sazonal da espécie no outono e inverno (MARQUES; ALMEIDA-SANTOS; RODRIGUES, 2006, este trabalho). O ritual de combate em *M. l. carvalhoi* foi observado durante o início do inverno e coincide, portanto, com o crescimento folicular (MARQUES; PIZZATO; ALMEIDA-SANTOS, 2013). Assim o combate entre machos está relacionado a estação de acasalamento e ao SSR que está hipertrofiado nesse período (SEVER; HOPKINS, 2005).

Outro fator que corrobora a hipótese de que as fêmeas estejam receptivas no outono é o maior tamanho dos epitélios vaginal e infundibular e tecido conjuntivo do

infundíbulo neste período, que se preparam para receber os espermatozoides de uma possível cópula, além da presença de glândulas mucosas na estação anterior, verão, que pode indicar algum tipo de preparação da fêmea para a estação de cópula. Rojas, Barros e Almeida-Santos (2015) relatam processos semelhantes para *Phylodrias patagoniensis*, reforçando o grau de especialização do oviduto das serpentes e todos os processos envolvidos, ainda pouco estudados.

Uma das descobertas deste trabalho foi uma fêmea com espermatozoides no infundíbulo posterior no outono. Este indivíduo apresentava somente folículos em V1, que não poderiam ser prontamente fecundados, fato que juntamente com as análises histológicas do infundíbulo anterior evidenciando formação de receptáculos ciliados é um indicativo de que as fêmeas dessa espécie podem estocar espermatozoides como outras espécies de serpentes (SIEGEL, et al., 2014; ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2015). Esta descoberta é muito importante, porque a estratégia de estocagem de espermatozoides em *Micrurus* não é bem conhecida, havendo anteriormente a este trabalho, poucos relatos na literatura (QUINN, 1979).

Assim, se o período de cópula ocorre entre o outono e o inverno e as fêmeas podem copular em vitelogênese primária, talvez a cópula seja responsável por induzir o crescimento dos folículos em *Micrurus lemniscatus carvalhoi*, ou seja, a percepção do acasalamento parece obrigatória para a iniciação e manutenção da vitelogênese (MENDONÇA; CREWS, 1990; MANES et al., 2007).

2.5 CONCLUSÕES

Os machos de *Micrurus lemniscatus carvalhoi* apresentam comportamento de combate coincidente com o pico espermático, no inverno. Assim o fato de produzirem espermatozoides durante todo o ano, porém apresentarem um pico de produção em um período específico, classifica seu ciclo reprodutivo como contínuo cíclico.

As fêmeas de *M. l. carvalhoi* possuem seu período de vitelogênese no outono e inverno, o qual coincide com o período no qual se encontram receptivas (fase de estro), sendo seu ciclo classificado como descontínuo cíclico. Quando copulam

nesta época podem tanto fertilizar prontamente seus folículos quanto estocar espermatozoides.

Sendo assim, o ciclo reprodutivo da espécie é sazonal sincrônico.

REFERÊNCIAS

- ALDRIDGE, R. D. Female reproductive cycles of the snakes *Arizona elegans* and *Crotalis viridis*. **Herpetologica**, v. 35, p. 256-261, 1979.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; BRAZ, H. B.; SANTOS, L. C.; SUEIRO, L. R.; BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; KASPEROVICZUS, K. N. Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados. **Herpetologia Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 14-24, 2014.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; PIZZATTO, L.; MARQUES, O. A. V. Intra-sex synchrony and inter-sex coordination in the reproductive timing of the coral snake *Micrurus corallinus* (Elapidae). **Herpetological Journal**, v. 16, p. 371–376, 2006.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Long-Term Sperm-storage in Female Neotropical Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). **Japanese Journal of Herpetology**, v. 17, n. 2, p. 46-52, 1997.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SCHIDMIT, F. L.; BALESTRIN, R. L. *Micrurus frontalis* (Coral Snakes) Male Combat. **Herpetological Review**, v. 29, p. 242-242, 1998.
- BAUMAN, M. A.; METTER, E. Reproductive cycle of the northern watersnake, *Natrix s. sipedon* (Reptilia, Serpentes, Colubridae). **Journal of Herpetology**, v. 11, n. 1, p. 51-59, 1977.
- BRAZ, H. B.; SCARTOZZONI, R. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive modes of the South American water snakes: A study system for the evolution of viviparity in squamate reptiles. **Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology**, v. 263, p. 33-44, 2016.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of the Western hemisphere**. Ithaca, U.S.A.: Comstock Publishing Associates, v. 1, p. 476, 2004.
- CHAN, L. M. Seasonality, microhabitat and cryptic variation in tropical salamander reproductive cycles. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 78, n. 4, p. 489-496, 2003.
- DOWLING, H.G. A proposed standard system of counting ventrals in snakes. **British Journal of Herpetology**, v. 1, p. 97–99, 1951.
- FRANÇA, F. G. R. **O mimetismo das serpentes corais em ambientes campestres, salvânicos e florestais da América do Sul**. 2008. 153 p. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2008.

FORD, N. B.; SEIGEL, R. A. Relationships among body size, clutch size, and egg size in three species of oviparous snakes. **Herpetologica**, p. 75-83, 1989.

GOLDBERG, S. R. Notes on reproduction in the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes: Elapidae) from Costa Rica. **Caribbean Journal of Science**, v. 40, n. 3, p. 420-422, 2004.

GOLDBERG, S. R. Reproduction in the western coral snake, *Micruroides euryxanthus* (Elapidae), from Arizona and Sonora, Mexico. **The Great Basin Naturalist**, v. 57, n. 4, p. 363-365, 1997.

GREENE, H. W. **Snakes: the evolution of mystery in nature**. London: University of California Press, p. 351, 1997.

GRIBBINS, K. M.; RHEUBERT, J. L.; POLDEMANN, E. H.; COLLIER, M. H.; WILSON, B.; Wolf, K.- Continuous spermatogenesis and the germ cell development strategy within the testis of the Jamaican Gray Anole, *Anolis lineatopus*. **Theriogenology**, v. 72, n. 4, p. 484-492, 2009.

JACKSON, D. R.; FRANZ, R. Ecology of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) in northern peninsular Florida. **Herpetologica**, v. 37, p. 213-228, 1981.

JELLEN, B. C., GRAHAM, S. P., ALDRIDGE, R. D., EARLEY, R. L. Oestrus in a secretive species: endogenous estradiol varies throughout the shed cycle and influences attractiveness in wild northern watersnakes (*Nerodia sipedon*). **Behaviour**, v. 151, n. 4, p. 403-419, 2014.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical Journal**, v. 11, p. 447-455, 1979.

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

KROHMER, R. W.; MARTINEZ, D.; MASON, R. T. Development of the renal sexual segment in immature snakes: effect of sex steroid hormones. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 139, p. 55-64, 2004.

MANES, M. E.; NORIEGA, T.; CAMPOS CASAL, F.; APICHELA, S. Ovarian changes during the reproductive cycle of the *Tupinambis merianae* lizard raised in a temperate environment. **Cuadernos de Herpetologia**, v. 21, n. 1, p. 21-29, 2007.

MARQUES, O. A. V. **História natural de *Micrurus corallinus* (Serpentes, Elapidae)**. 1992. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

MARQUES, O. A. V. Reproduction, seasonal activity and growth of the *Micrurus corallinus* (Serpentes, Elapidae). **Amphibia Reptilia**, v. 17, p. 277-285, 1996.

MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; RODRIGUES, M. G. Activity patterns in coral snakes, genus *Micrurus* (Elapidae), in south and Southeastern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 1, n. 2, p. 114-120, 2006.

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

MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. História natural dos répteis da estação ecológica Juréia-Itatins. In: MARQUES, O. A. V.; DULEBA, W. (Ed.). **Estação ecológica Juréia-Itatins: ambiente físico, flora e fauna**. Ribeirão Preto: [s.n.] p. 257-277, 2004.

MARQUES, O. A. V.; SAWAYA, R. J.; STENDER-OLIVEIRA, F.; FRANÇA, F. G. R. Ecology of the colubrid snake *Pseudablabes agassizii* in south-eastern South America. **Herpetological Journal**, v. 16, p. 37-45, 2006.

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

MATHIES, T. **Reproductive cycles of tropical snakes**. New Hampshire: Science Publishers, Enfield. v. 1, p. 511-550, 2011.

MENDONÇA, M. T.; CREWS, D. Mating-induced ovarian recrudescence in the red-sided garter snake. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 166, n. 5, p. 629-632, 1990.

OLIVEIRA, L.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; COSTA, A. C. O. R.; SCARTOZZONI, R. R.; GERMANO, V. J.; SALOMAO, M. G. Manutenção de serpentes em cativeiro no Instituto Butantan: I - A longevidade do gênero *Micrurus*. **Publicações avulsas do Instituto Pau Brasil de História Natural**, v. 8-9, p. 55-61, 2005.

PIRES, M. G. Revisão **Taxonômica do complexo *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Elapidae)**. 2011. 39 f. Tese (Doutorado em Ciências, Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PIRES, M. G.; SILVA JR, N. J.; FEITOSA, D. T.; PRUDENTE, A. L. C.; PEREIRA FILHO, G. A.; ZAHER, H. A new species of triadal coral snake of the genus *Micrurus* (Wagler, 1824) (Serpentes: Elapidae) from northeastern Brazil. **Zootaxa** (Online), v. 3811, p. 569-584, 2014.

PLEGUEZUELOS, J. M.; FERICHE, M. Reproductive ecology of the horseshoe whip snake *Coluber hippocrepis* in the Iberian Peninsula. **Journal of Herpetology**, v. 33, n. 2, p. 202-207, 1999.

QUINN, H. R. Reproduction and growth of the Texas coral snake (*Micrurus fulvius tenere*). **Copeia**, v. 1979, n. 3, p. 453-463, 1979.

- RASBAND, W. **ImageJ 1.46r**. National institute of health, USA, 2011. Disponível em: <<http://imagej.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 07 maio 2016.
- 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**, 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**, v. 134, n. 4, p. 577-586, 2015.
- ROZE, J. A. **Coral snakes of the Americas**: biology, identification, and venoms. Malabar, Florida: Krieger Publishing Company, 1996.
- SCHUETT, G. W.; CARLISLE, S. L.; HOLYCROSS, A. T.; O'LEILE, J. K.; HARDY, D. L.; VAN KIRK, E. A.; MURDOCH, W. J. Mating system of male Mojave rattlesnakes (*Crotalus scutulatus*): seasonal timing of mating, agonistic behavior, spermatogenesis, sexual segment of the kidney, and plasma sex steroids. In: SCHUETT, G. W.; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENER, H. W. **Biology of the vipers**. , Utah, USA: Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountainp. 2002. 515-532.
- SERAFIM, H.; PECCININI-SEALE, D. M.; BATISTIC, R. F. Estudo cariotípico de duas espécies brasileiras do gênero *Micrurus* (Ophidia: Elapidae). **Biota Neotropica**, v. 7, p. 1-6, 2007.
- SEVER, D. M. Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). IV. Occurrence of an ampulla ductus deferentis. **Journal of Morphology**, v. 262, n. 3, p. 714-730, 2004.
- SEVER, D. M.; HOPKINS, W. A. Renal sexual segment of the ground skink, *Scincella laterale* (Reptilia, Squamata, Scincidae). **Journal of Morphology**, v. 266, n. 1, p. 46-59, 2005.
- SEVER, D. M.; SIEGEL, D. S.; BAGWILL, A.; ECKSTUT, M. E.; ALEXANDER, L.; CAMUS, A.; MORGAN, C. Renal sexual segment of the cottonmouth snake, *Agkistrodon piscivorous* (Reptilia, Squamata, Viperidae). **Journal of Morphology**, v. 269, n. 6, p. 640-653, 2008.
- SEVER, D. M.; STEVENS, R. A.; RYAN, T. J.; HAMLETT, W. C. Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). III. Sexual segment of the male kidney. **Journal of Morphology**, v. 252, p. 238-254, 2002.
- SHINE, R. Reproduction in Australian elapid snakes. I. Testicular cycles and mating seasons. **Australian Journal of Zoology**, v. 25, p. 647-653, 1977a.
- SHINE, R. Sexual dimorphism in snakes revisited. **Copeia**, v. 1994, p. 326-46, 1994

SHINE, R.; BONNET, X. Reproductive biology, population viability, and options for field management. **Snakes – Ecology and Conservation**. Cornell University Press, Ithaca, 2009.

SIEGEL, D. S.; MIRALLES, A.; CHABARRIA, R. E.; ALDRIDGE, R. D. Female reproductive anatomy: cloaca, oviduct, and sperm storage. In: JUSTIN, L.; RHEUBERT, D. S. S.; STANLEY, E. T. **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. New Hampshire: CRC Press. Chap. 6, p. 347-409, 2014.

SIEGEL, D. S.; SEVER, D. M. Utero-muscular twisting and sperm storage in viperids. **Herpetological Conservation and Biology**, v. 1, n. 2, p. 87-92, 2006.

SILVA, K. B.; ZOGNO, M. A.; CAMILLO, A. B.; PEREIRA, R. J. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Annual changes in seminal variables of golden lancehead pitvipers (*Bothrops insularis*) maintained in captivity. **Animal Reproduction Science**, v. 163, p. 144-150, 2015.

SILVA, K. M. P. D.; SUEIRO, L. R.; GALASSI, G. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. D. Reprodução de *Bothrops* spp. (Serpentes, Viperidae) em criadouro conservacionista. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 4, p. 632-642, 2014.

SILVA JR., N. J.; SITES JR., J. W. Phylogeny of South American triad coral snakes (Elapidae: *Micrurus*) based on molecular characters. **Herpetologica**, v. 57, n. 1, p. 1-22, 2001.

SLOWINSKI, J. B. A phylogenetic analysis of the New World coral snakes (Elapidae: *Leptomicrurus*, *Micruroides* and *Micrurus*) based on allozymic and morphological characters. **Journal of Herpetology**, v. 29, n. 3, p. 325-338, 1995.

SOLÓRZANO, A.; CERDAS, L. Biología reproductiva de la cascabel centroamericana *Crotalus durissus durissus* (Serpentes: Viperidae) en Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v. 36, n. 2A, p. 221-6, 1988.

SOLÓRZANO, A.; CERDAS, L. Ciclos reproductivos de la serpiente coral *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes: Elapidae) en Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v. 36, n. 2A, p. 235-239, 1988.

ZAR, J. R. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, p. 875, 1999.

CAPÍTULO 2: Biologia Reprodutiva de *Micrurus lemniscatus* da Amazônia

3 BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *MICRURUS LEMNISCATUS* DA AMAZÔNIA

3.1 INTRODUÇÃO

A Floresta Amazônica é conhecida por propiciar boas condições ambientais, as quais determinam sua grande diversidade de formas de vida (DUELLMAN, 1978; LEITÃO-FILHO, 1985; KERR; CARVALHO; SILVA, 2015). Essas condições ambientais, entretanto, sofrem variações ao longo do ano e definem para este bioma duas estações, a estação seca e a estação chuvosa, sendo esta última conhecida por causar grandes alagamentos que influenciam fortemente o modo de vida neste habitat (GOULDING; CARVALHO, 1982; KUBITZKI, 1989).

Estudos reprodutivos com animais desta região podem mostrar diferentes resultados, derivados da estratégia reprodutiva que melhor se adapta a cada espécie, podendo as espécies tenderem a um ciclo que se estende na estação mais propícia (SILVA, 2015) ou restringirem sua reprodução sazonalmente (WIKELSKI; HAU; WINGFIELD, 2000).

A herpetofauna da região amazônica brasileira é tema de vários estudos atuais envolvendo reprodução (VITT; BLACKBURN, 1991; MIRANDA; ANDRADE, 2003; DE SOUSA; PRUDENTE; MASCHIO, 2014), porém nenhum deles aborda as diversas espécies de *Micrurus* existentes, que vivem em simpatria neste bioma (ROZE, 1996; CAMPBELL; LAMAR, 2004).

Micrurus lemniscatus (Linnaeus, 1758) é, atualmente, a cobra-coral de tríades mais amplamente distribuída pela América do Sul e, no Brasil, ocorre em todos os ecossistemas, com exceção do Pantanal (PIRES, 2011). Esta grande distribuição gera dificuldade em interpretar as formas ocorrentes, o que levou esta espécie a ser considerada como um complexo (SILVA JR.; SITES, 2001).

Das subespécies que integram o complexo *M. lemniscatus*, três habitam a região amazônica, sendo elas: *Micrurus lemniscatus lemniscatus* na planície de florestas tropicais, floresta úmida aberta e terras cultivadas secas no norte das Guianas e Suriname, atingindo o norte do Pará e Maranhão Brasileiros; *Micrurus*

lemniscatus helleri em florestas úmidas e chuvosas das encostas orientais dos Andes, nos dois lados da Amazônia, com distribuição incerta no Brasil e *Micrurus lemniscatus diutius* em planícies de florestas úmidas e de baixas montanhas, ocasionalmente também em terras cultivadas abertas e na região central da Amazônia do Brasil (ROZE, 1996).

Micrurus lemniscatus é conhecida por predar principalmente vertebrados alongados como gimnofionos, anfisbenas, serpentes e lagartos, podendo também predar peixes, o que pode indicar um comportamento semiaquático (CUNHA; NASCIMENTO, 1993; MARTINS; OLIVEIRA, 1998). No entanto, no Acre foram encontrados pelos de mamífero no trato digestório dessa serpente (SILVA; SOUZA; BERNARDE, 2010).

Os dados macroscópicos levantados por Roze (1996) sobre a reprodução dessa espécie na Amazônia indicam que a cópula ocorre durante a estação seca e a oviposição ocorre em um curto tempo antes do começo da estação chuvosa, sendo que as altas temperaturas e umidade durante praticamente todo o ano propiciam que o ciclo reprodutivo dessas cobras corais seja irregular ou mesmo não cíclico.

O ciclo reprodutivo irregular ou não cíclico pode incluir o conceito de reprodução estendida, proposto por Mathies (2011) que se aplica as fêmeas quando há um período de vitelogênese secundária longo, entre 6 a 10 meses e gravidez durando de 4 a 7 meses no ano, porém no caso das *Micrurus lemniscatus* amazônicas até o momento só foram observadas fêmeas com ovos entre os meses de junho e julho (ROZE, 1996).

Sendo assim, este estudo investigará os aspectos reprodutivos de *Micrurus lemniscatus* da Amazônia, por meio de análises histológicas e morfológicas das gônadas e vias genitais. Além disso, tem como objetivo elucidar os processos vitelogênicos e espermatogênicos do ciclo das subespécies presentes nesse bioma e comparar suas estratégias reprodutivas.

3.2 MATERIAL E MÉTODO

Inicialmente, todos os indivíduos de *M. lemniscatus*, tiveram sua procedência e data de coletas anotadas. Em seguida foram tomados dados merísticos segundo

Dowling (1951) (contagem das escamas ventrais e subcaudais de cada um dos espécimes), contagem das tríades (três anéis negros em sequência) e verificação do sexo, o compilado dessas informações foi utilizado para separá-los em subespécies, de acordo com a Tabela 3. Estes dados foram utilizados para compor as análises biogeográficas com o uso do programa QGIS para a montagem do mapa de distribuição.

Tabela 3 - Características que definem as subespécies de *Micrurus lemniscatus*

Subespécie	Número de ventrais	Número de subcaudais	Número de tríades	Estados do Brasil
<i>carvalhoi</i>	M 224-263 F 222-267	M 25-39 F 26-38	M 10-15 F 9-16	PR, SP, MG, MT, BA, RN
<i>helleri</i>	M 230-248 F 240-260	M 33-41 F 34-43	M 9-11 F 8-11	AM, AC, RO
<i>diutius</i>	M 212-225 F 225-242	M 31-38 F 31-37	M 7-11 F 8-11	AM, AP
<i>lemniscatus</i>	M 235-246 F 242-264	M 36-40 F 31-39	M 12-15 F 11-14	PA, MA

Fonte: (ROZE, 1996; CAMPBELL; LAMAR, 2004; PIRES; SILVA JR.; FEITOSA, et al., 2014).

Legenda: M= machos, F= fêmeas, PR=Paraná, SP = São Paulo, MG = Minas Gerais, MT= Mato Grosso, BA = Bahia, RN = Rio Grande do Norte, AM = Amazonas, AC = Acre, RO = Rondônia, AP = Amapá, PA = Pará e MA = Maranhão.

Foram examinados 24 exemplares de *Micrurus lemniscatus diutius*, sendo 13 machos e 11 fêmeas, 45 exemplares de *Micrurus lemniscatus helleri*, sendo 30 machos e 15 fêmeas e 22 exemplares de *Micrurus lemniscatus lemniscatus*, sendo 14 machos e 8 fêmeas provenientes da Floresta Amazônica (Figura 20).

Figura 20 - Distribuição geográfica dos espécimes de *Micrurus lemniscatus helleri*, *Micrurus lemniscatus lemniscatus* e *Micrurus lemniscatus diutius* analisados

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: = ocorrências de *M. l. helleri*, = ocorrências de *M. l. lemniscatus*, = ocorrências de *M. l. diutius*.

Estes espécimes estavam preservados em coleções científicas do Norte, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, citados no quadro 2.

Quadro 2 - Lista de regiões e coleções científicas consultadas

Região	Coleção científica	Sigla
Norte	Instituto de pesquisas científicas e tecnológicas do estado do Amapá Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia Museu Paraense Emílio Goeldi Faculdades Integradas do Tapajós Universidade Federal do Acre Universidade Federal de Rondônia	IEPA INPA MPEG FIT UFAC UNIR
Centro Oeste	Universidade Federal de Mato Grosso	UFMT
Sudeste	Universidade Federal de Minas Gerais	UFMG

Fonte: (COETI, 2016).

Em seguida, foram coletados, com a ajuda de uma fita métrica milimetrada (mm) os seguintes dados morfológicos: comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento da cauda (CC) e comprimento da cabeça (CC).

Estes dados macroscópicos foram separados de acordo com a subespécie considerada e utilizados para comparar o maior indivíduo de cada sexo, (SOLÓRZANO; CERDAS, 1988), estabelecer o histograma de atividade sazonal da amostra (MARQUES; ALMEIDA-SANTOS; RODRIGUES, 2006) e averiguar a existência de dimorfismo sexual. O dimorfismo no tamanho do corpo (CRC) foi testado por teste-t de Student (ZAR, 1999).

Para comparar o dimorfismo sexual entre machos e fêmeas utilizou-se o índice utilizado por Shine (1994):

$$SSD = 1 - \left(\frac{CRC \text{ médio do sexo de maior tamanho}}{CRC \text{ médio do sexo de menor tamanho}} \right)$$

Onde SSD = sexual size dimorfism, ou dimorfismo do tamanho sexual, com o resultado sendo arbitrariamente definido como positivo quando as fêmeas são maiores e negativo quando os machos são maiores.

A seguir, efetuou-se uma incisão ventral ao longo do corpo dos indivíduos, tanto dos machos quanto das fêmeas, em aproximadamente dois terços do corpo,

na parte caudal e a partir desta incisão, foram tomadas medidas dos órgãos sexuais de acordo com Almeida-Santos et al. (2014).

Nas fêmeas, foram registrados: o estágio folicular, podendo ser classificado em vitelogênese primária (V1) ou vitelogênese secundária (V2), o número e o tamanho dos folículos ovarianos ou ovos e a presença ou não de contração muscular uterina (UMT).

Nos machos, os seguintes dados foram tomados: comprimento, largura e espessura dos testículos direito e esquerdo, largura do ducto deferente direito e esquerdo na porção caudal e comprimento e largura do rim direito.

Estes procedimentos foram registrados com fotografia digital, utilizando-se máquina fotográfica SONY DSC-W35. As estruturas anatômicas foram observadas a olho nu. Utilizou-se paquímetro digital com precisão de 0,1 mm para realizar as medidas.

Os dados referentes ao testículo determinaram o volume testicular (VT) segundo a fórmula para o volume da elipsoide (PLEGUEZUELOS; FERICHE, 1999):

$$VT = \frac{4}{3} (a.b.c),$$

Onde a= metade do comprimento do testículo, b = metade da largura do testículo, c = metade da espessura do testículo.

Os dados referentes aos ductos deferentes foram utilizados como a média da soma de seus diâmetros.

Após a morfometria, coletaram-se fragmentos de aproximadamente 100 mm dos espécimes adquiridos.

Nas fêmeas, foram coletados fragmentos de infundíbulo, útero, junção útero-vaginal, vagina e folículos. Nos machos, foram coletados fragmentos de testículo, ducto deferente e rim. Os fragmentos coletados foram devidamente etiquetados e conservados em álcool 70%.

Para a realização do estudo histológico de microscopia de luz, as amostras foram desidratadas em uma série crescente de etanol, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100%. As amostras ficaram submersas por 15 minutos em cada uma das concentrações e logo em seguida foram diafanizadas em Xilol I por 20 minutos e em Xilol II por mais 20 minutos.

Concomitante a diafanização, as amostras passaram por dois banhos de parafina: o primeiro overnight (12 horas) e o segundo por 6 horas. Logo após foram incluídas transversalmente ou longitudinalmente, obtendo-se blocos da amostra dentro da parafina.

Os blocos de parafina foram cortados com a ajuda de um micrótomo (Leica) em fitas de 5 µm de espessura. Essas fitas foram coladas a lâminas de vidro com uso de gelatina.

As lâminas com os cortes foram então submetidas ao processo de coloração por Hematoxilina/Eosina de acordo com Junqueira, Bignolas e Brentani (1979) e em seguida foram coladas lamínulas sobre elas, utilizando-se *permount*.

As imagens das lâminas histológicas foram capturadas por meio do fotomicroscópio Olympus BX61VS.

Essas imagens foram utilizadas, juntamente com as medidas morfométricas, para indicar o tamanho do menor macho maduro e da menor fêmea madura para cada subespécie, para caracterizar a morfologia reprodutiva de machos e fêmeas e para evidenciar o crescimento folicular.

A partir destas, também foram tiradas medidas morfométricas com o auxílio do programa ImageJ version 1.46 (RASBAND, 2011).

Para a realização do estudo histológico de microscopia eletrônica de varredura, as amostras que já estavam em álcool 70%, foram submetidas a uma desidratação de série etanólica de concentração crescente, passando por duas séries de 15 minutos em álcool 95% e três séries de 15 minutos em álcool 100%. Em sequência foram secas através do método de ponto crítico, utilizando o dióxido de carbono como fluido de transição. Após isso o material então foi montado sobre stubs utilizando-se fita adesiva dupla-face e cola de prata e coberto com banho de ouro usando o sistema de *sputtering*.

As imagens foram analisadas e capturadas no microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 250 e foram utilizadas para caracterizar a estocagem de espermatozoides no útero.

Para os machos foram obtidas de cinco a dez medidas de cada estrutura a fim de se obter uma média. As estruturas medidas foram: o diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio seminífero nos cortes de testículo, diâmetro dos túbulos e altura do epitélio dos segmentos sexuais renais e o diâmetro e altura do epitélio dos ductos deferentes.

Para as fêmeas foram obtidas medidas do epitélio da vagina e do infundíbulo posterior e do tamanho do tecido conjuntivo do infundíbulo posterior com a finalidade de quantificar a variação destas estruturas ao longo das estações.

Antes das análises estatísticas, todos os dados foram verificados quanto a sua normalidade e homogeneidade de variâncias, e diferenças significativas (quando $P < 0,05$) foram analisadas pelo teste Post-hoc de Tukey. Estas análises foram feitas com ajuda dos softwares *Instat* e *Statistica* versão 7.

Para comparações entre fatores que apresentaram correlação nas análises estatísticas preliminares, foram escolhidas análises de covariância (ANCOVA), de forma a eliminar o efeito do tamanho do corpo para cada variável (MARTINS et al., 2001). Para a realização de todos os testes, estas variáveis morfológicas foram transformadas em seu logaritmo natural (ZAR, 1999).

A construção de gráficos que usaram ANCOVA foi feita a partir dos resíduos das regressões lineares entre essas variáveis e o CRC. Os resíduos foram utilizados para eliminar a influência do tamanho do corpo sobre as variáveis de interesse (MARQUES et al., 2006) e serviram apenas para ilustração dos ciclos.

Os gráficos foram elaborados nos softwares Microsoft Office Excel 2010 e Statistica 7.

Como o diâmetro macroscópico dos ductos deferentes varia de acordo com a produção de espermatozoides, foi descartada uma possível relação deste com o CRC, sendo utilizadas então análises com o teste t para este parâmetro. As medidas microscópicas também foram testadas por teste t. Amostras não homogêneas foram testadas com o teste não paramétrico Mann-Whitney.

Por conta do número reduzido de espécimes e levando em consideração alguns autores (BARRIO-AMORÓS; CALCAÑO, 2003; PIRES, 2011) neste trabalho, os dados das subespécies *M. l. helleri* e *M. l. lemniscatus* foram somados, sendo considerados com o nome *Micrurus lemniscatus lemniscatus*.

Os testes preliminares descartaram os valores do volume dos testículos para *M. l. lemniscatus* e a pequena quantidade de dados para *M. l. diutius* não passou nos testes de homogeneidade, sendo assim estes parâmetros não puderam ser considerados.

3.3 RESULTADO

3.3.1 Dimorfismo e maturidade sexual

As medidas de machos e fêmeas das *Micrurus lemniscatus* da Amazônia apresentaram diferenças, sendo que as fêmeas de *Micrurus lemniscatus lemniscatus* apresentaram os menores valores de CRC da amostra (Figura 21A) e os machos de *Micrurus lemniscatus lemniscatus* os maiores (Figura 21B). A atividade sazonal da amostra (Figura 21C) atinge maiores valores na estação seca.

Figura 21 - Variação dos CRCs de fêmeas e machos ao longo do ano e atividade sazonal

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Comprimento rostro-cloacal das fêmeas ao longo do ano; B) Comprimento rostro-cloacal dos machos ao longo do ano; C) Atividade sazonal da amostra; M.l.l. = *Micrurus lemniscatus lemniscatus*, M.l.d. = *Micrurus lemniscatus diutius*.

As análises estatísticas para *Micrurus lemniscatus lemniscatus* indicam que o comprimento rostro-cloacal não apresenta diferença significativa entre os sexos ($t = 0.2630$; $gl = 65$; $P = 0.793$; Tabela 4), assim como o comprimento da cabeça (Tabela 4), entretanto o comprimento relativo da cauda é significativamente diferente, sendo maior nos machos (Tabela 4). O cálculo do índice de dimorfismo sexual (SSD) para esta subespécie foi de -0,02.

Tabela 4 - Dados morfológicos dos machos e fêmeas de *Micrurus lemniscatus lemniscatus*

Variável	Média $\pm$ DP	Mínimo-Máximo	N
CRC (mm)	(M) 708,5 $\pm$ 273,1 (F) 691,4 $\pm$ 206,1	(M) 261 – 1388 (F) 342 – 1001	(M) 44 (F) 23
CC (mm)	(M) 60,3 $\pm$ 24,5 (F) 54,2 $\pm$ 19,2	(M) 20 – 117 (F) 20 – 92	(M) 44 (F) 23
Ccab (mm)	(M) 16,8 $\pm$ 7,4 (F) 15,3 $\pm$ 5,0	(M) 6 – 34 (F) 8 – 25	(M) 44 (F) 23

Variável	Correlação	ANCOVA	N
Log CRC-Log CC	$r = 0,952$; $P < 0,01$	$F_{(1, 64)} = 7,290$, $P = 0,008$	67
Log CRC-Log Cab	$r = 0,913$; $P < 0,01$	$F_{(1, 64)} = 1,308$, $P = 0,256$	67

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: DP = desvio padrão, log = logaritmo natural, CRC = comprimento rostro-cloacal, CC = comprimento da cauda, Ccab = comprimento da cabeça.

As análises para *Micrurus lemniscatus diutius* também mostram que o comprimento rostro-cloacal, não possui diferença significativa entre os sexos ($t = 0.279$; $gl = 22$; $P = 0.782$; Tabela 5), assim como comprimento relativo da cauda (Tabela 5), entretanto o comprimento da cabeça apresenta uma diferença significativa, sendo maior nos machos (Tabela 5). O cálculo do índice de dimorfismo sexual (SSD) para esta subespécie foi de 0,02.

Tabela 5 - Dados morfológicos dos machos e fêmeas de *Micrurus lemniscatus diutius*

Variável	Média ± DP	Mínimo-Máximo	N
CRC (mm)	(M) 744,0 ± 207,6 (F) 765,9 ± 168,6	(M) 409 – 1051 (F) 551 – 1036	(M) 13 (F) 11
CC (mm)	(M) 65,3 ± 15,8 (F) 66,9 ± 19,8	(M) 41 – 91 (F) 38 – 100	(M) 13 (F) 11
Ccab (mm)	(M) 21,4 ± 5,6 (F) 19,3 ± 4,9	(M) 12 – 31 (F) 12 – 26	(M) 13 (F) 11

Variável	Correlação	ANCOVA	N
Log CRC-Log CC	$r = 0,923; P < 0,01$	$F_{(1, 21)} = 0,580, P = 0,454$	24
Log CRC-Log Cab	$r = 0,800; P < 0,01$	$F_{(1, 21)} = 4,729, P = 0,041$	24

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: DP = desvio padrão, log = logarítimo natural, CRC = comprimento rostro-cloacal, CC = comprimento da cauda, Ccab = comprimento da cabeça.

Os dados de maturidade sexual em *M. l. lemniscatus* indicam que o menor macho sexualmente maduro da amostra foi encontrado na estação chuvosa e possui 461 mm de CRC, apresentando testículo em regressão e SSRs hipertrofiados, evidenciados histologicamente na figura 22A e 22B. A menor fêmea considerada madura apresentou folículos em V2 com 30,03 mm de comprimento e mediu 468 mm de CRC.

Já o observado para maturidade sexual em *M. l. diutius* indica que o menor macho sexualmente maduro da amostra foi encontrado na estação Seca, com 486 mm de CRC, apresentando testículo em espermição e espermatozoides no ducto deferente, evidenciados histologicamente na figura 22D e 22E. A menor fêmea considerada madura apresentou folículos em V2 com 16,91 mm de comprimento e mediu 575 mm de CRC.

Figura 22 - Cortes histológicos transversais dos menores machos maduros de *Micrurus lemniscatus lemniscatus* e *Micrurus lemniscatus diutius*

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Túbulos seminíferos de *M. l. lemniscatus* em regressão; B) Corte do rim de *M. l. lemniscatus* evidenciando os SSRs hipertrofiados; C) Túbulos seminíferos de *M. l. diutius* em estágio de espermição; D) Ducto deferente de *M. l. diutius* com espermatozoides na luz; S = espermatozoides, Se = espermátides, Sg = espermátogônias, Sp = espermátocitos; SSR = segmento sexual renal, L = luz.

3.3.2 Biologia reprodutiva dos machos

Os testículos de *Micrurus lemniscatus lemniscatus* e *Micrurus lemniscatus diutius* não apresentaram diferença morfológica, possuindo um formato oval. O testículo direito é mais cranial que o esquerdo e localizam-se no terço caudal da cavidade celomática, como descrito para a maioria das serpentes (Figura 23).

Figura 23 - Sistema urogenital masculino de *M. l. lemniscatus* e *M. l. diutius*

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Sistema urogenital masculino, parte cranial, evidenciando Td = testículo direito, Te = testículo esquerdo, Rd = rim direito, Re = rim esquerdo; B) Sistema urogenital masculino, parte cranial, evidenciando os túbulos seminíferos a olho nu e a glândula adrenal, C) Sistema urogenital masculino, parte caudal, evidenciando o Rim e o Ducto Deferente enovelado.

Para *M. l. lemniscatus*, a variação para o epitélio ($t = 0,256$, $gl = 27$, $P = 0,799$, $n = 29$) e diâmetro ($t = 0,499$, $gl = 27$, $P = 0,621$, $n = 29$) dos túbulos seminíferos não foi significativa ao longo das estações (Figura 24A e 24B).

Figura 24 - Variação do epitélio e diâmetro dos túbulos seminíferos de *M. l. lemniscatus* durante o ano

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Variação média do epitélio dos túbulos seminíferos, B) Variação média do diâmetro dos túbulos seminíferos.

Em relação ao rim direito, não houve diferenças significativas no comprimento ao longo das estações (Figura 25A), porém a diferença no diâmetro foi significativa (Tabela 6). Os testes posteriores mostraram que o diâmetro do rim diferiu entre as estações, sendo maior na estação seca (teste de Tukey: $P = 0,04$) (Figura 25B).

Tabela 6 - Dados estatísticos dos machos de *Micrurus lemniscatus lemniscatus*

Variável	Correlação	ANCOVA	N
Log CRC-Log Rc	$r = 0,925$; $P < 0,01$	$F_{(1, 33)} = 0,223$, $P = 0,639$	39
Log CRC-Log Rd	$r = 0,900$; $P < 0,01$	$F_{(1, 33)} = 3,407$, $P = 0,073$	39

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: log = logaritmo natural, CRC = comprimento rostro-cloacal, Rc = comprimento do rim, Rd= diâmetro do rim.

A variação para a média do diâmetro ($U = 53$, $P = 0,106$, $n = 30$) e epitélio ($U = 65$, $P = 0,807$, $n = 27$) dos segmentos sexuais renais não foi significativa entre as estações (Figura 25C e 25D).

Figura 25 - Variação do comprimento e diâmetro dos rins e do epitélio e diâmetro dos segmentos sexuais renais de *M. l. lemniscatus* durante o ano

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Variação do comprimento do rim, B) Variação do diâmetro do rim, C) Variação média do epitélio dos segmentos sexuais renais (SSRs), D) Variação média do diâmetro dos SSRs.

A variação do diâmetro macroscópico dos ductos deferentes ($t = 1,458$, $gl = 34$, $P = 0,154$, $n = 36$; Figura 26A) não foi significativa entre as estações, bem como a variação microscópica do epitélio ($t = 0,698$, $gl = 28$, $P = 0,490$, $n = 30$; Figura 26B) e do diâmetro ($t = 0,510$, $gl = 28$, $P = 0,613$, $n = 30$; Figura 26C).

Figura 26 - Variação do diâmetro e variações médias do epitélio e diâmetro dos ductos deferentes de *M. l. lemniscatus* durante o ano

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Variação do diâmetro dos ductos deferentes, B) Variação média do epitélio dos ductos deferentes, C) Variação média do diâmetro dos ductos deferentes.

A análise histológica de *M. l. lemniscatus* evidencia produção de espermatozoides dentro dos túbulos seminíferos durante as duas estações (Figura 27A e 27D), sem diferenças aparentes na linhagem espermática, exceto por um indivíduo encontrado na estação chuvosa que apresentou testículos em regressão.

Os SSRs estão hipertrofiados ao longo das duas estações (Figura 27B e 27E), entretanto apresentam comparativamente maior tamanho e grau de secreção na estação seca (Figura 27E)

Há presença de espermatozoides na luz dos ductos ao longo das estações (Figura 27C e 27F) e presença destes adjacentes ao epitélio dos ductos (Figura 27F). O indivíduo em regressão foi o único a não apresentar espermatozoides no ducto deferente.

Figura 27 - Cortes histológicos de testículos, rins e ductos deferentes de *M. l. lemniscatus*

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A), B) e C) = túbulos seminíferos, SSRs e ductos deferentes na estação chuvosa; D), E) e F) = túbulos seminíferos, SSRs e ductos deferentes na estação seca; S = espermatozoides, Se = espermátides, Sp = espermatócitos, Sg = espermatozógonias, SSR = segmento sexual renal, seta = espermatozoides alinhados ao epitélio do ducto.

A análise histológica de *M. l. diutius* evidencia produção de espermatozoides dentro dos túbulos seminíferos durante as duas estações (Figura 28A e 28D), sem diferenças aparentes na linhagem espermática. Os SSRs estão hipertrofiados ao longo das estações (Figura 28B e 28E) e espermatozoides estão presentes na luz dos ductos durante todo o ano (Figura 28C e 28F).

Figura 28 - Cortes histológicos de testículos, rins e ductos deferentes de *M. l. diutius*

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A), B) e C) = túbulos seminíferos, SSRs e ductos deferentes na estação chuvosa; D), E) e F) = Túbulos seminíferos, SSRs e ductos deferentes na estação seca; S = espermatozoides, Se = espermátides, Sp = espermatócitos, Sg = espermátogônias, SSR = segmento sexual renal.

3.3.3 Biologia reprodutiva das fêmeas

As gônadas femininas de *M. l. lemniscatus* e *M. l. diutius* não apresentam diferenças morfológicas entre si.

Os folículos em vitelogênese primária (V1) para as *Micrurus lemniscatus* da amazônia possuem um formato arredondado e na amostra mediram de 1,01 mm a 9,18 mm, já os folículos em vitelogênese secundária (V2) são mais alongados e fusiformes e mediram de 10,94 mm a 30,44 mm (Figura 29). Os ovos mediram de 36,93 mm a 51,54 mm, sendo encontrados no mínimo 4 e no máximo 6 ovos por fêmea.

Figura 29 - Transição do sistema urogenital feminino de *M. l. lemniscatus* e *M. l. diutius*

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Fêmea em estágio inicial de diferenciação folicular; B) Fêmea em estágio final de diferenciação folicular, C) Fêmea grávida; In = infundíbulo, V1 = folículo em vitelogênese primária, V2 = folículo em vitelogênese secundária, O = ovo.

A distribuição dos folículos em V1 ocorre ao longo de todo o ano, enquanto os folículos em V2 aparecem predominantemente na estação seca tanto para *M. l. lemniscatus* quanto para *M. l. diutius* (Figura 30).

Fêmeas grávidas ocorrem entre o final da estação seca e o começo do período chuvoso para *M. l. lemniscatus* e no meio da estação seca para *M. l. diutius* (Figura 30).

Figura 30 - Gráfico de dispersão dos folículos de *M. l. lemniscatus* e *M. l. diutius*

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: Folículos em V1 = ●, Folículos em V2 = ●, Fêmeas grávidas = ■

Para *M. l. lemniscatus* a variação do epitélio da vagina ($t = 0,514$, $gl = 14$, $P = 0,614$, $n = 16$; Figura 31A), do epitélio do infundíbulo ($t = 0,119$, $gl = 11$, $P = 0,907$, $n = 13$; Figura 31B) e do tecido conjuntivo do infundíbulo ($t = 1,710$, $gl = 11$, $P = 0,115$, $n = 13$; Figura 31C) não foi significativa ao longo das estações.

Figura 31 - Crescimento epitelial e do tecido conjuntivo em fêmeas de *M. l. lemniscatus*

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Epitélio da vagina, B) Epitélio do infundíbulo, C) Tecido conjuntivo do infundíbulo.

As análises histológicas da vagina desta subespécie mostram um alto grau de secreção no lúmen e bolhas de secreção saindo do epitélio na estação chuvosa (Figura 32A) enquanto que a vagina da estação seca apresenta um epitélio aparentemente mais espesso (Figura 32B). Já as fotos do infundíbulo posterior evidenciam numerosas glândulas mucosas na estação chuvosa (Figura 32C) e uma provável regressão destas na estação seca (Figura 32D).

Figura 32 - Cortes histológicos de vagina e infundíbulo posterior de *M. l. lemniscatus*

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) e C) Vagina e Infundíbulo na estação chuvosa, B) e D) Vagina e infundíbulo na estação seca; e = epitélio, s = secreção, Gm = glândula mucosa, L = luz, seta = bolha de secreção saindo das células epiteliais.

Para *M. l. diutius* as análises histológicas da vagina mostram um epitélio comparativamente mais espesso na estação seca (Figura 33B) do que na chuvosa (Figura 33A). Já as fotos do infundíbulo evidenciam invaginações do epitélio, formando receptáculos ciliados na estação chuvosa (Figura 33C) e presença de resquícios de receptáculos na estação seca (Figura 33D).

Figura 33 - Cortes histológicos de vagina e infundíbulo posterior de *M. l. diutius*

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) e C) Vagina e infundíbulo na estação chuvosa, B) e D) Vagina e infundíbulo na estação seca; e = epitélio, s = secreção, L = luz, R = receptáculos ciliados.

3.3.4 Padrões de estocagem nas fêmeas

As subespécies amazônicas apresentaram padrões de estocagem de espermatozoides semelhantes nas fêmeas. O estudo histológico mostra que estes espermatozoides passam por invaginações do epitélio do útero posterior (Figura 34A e 34B) e sobem até o útero anterior, onde podem ser estocados em pequenos receptáculos ciliados (Figura 34C) ou adentrar o infundíbulo posterior (Figura 34D). Os espermatozoides devem ficar próximos aos cílios das células epiteliais, ao longo do oviduto, como mostram as imagens de microscopia de varredura (34E e 34F).

A estocagem foi encontrada somente na estação seca.

Figura 34 - Padrões de estocagem em fêmeas amazônicas de *M. l. diutius* e *M. l. lemniscatus*

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Junção útero-vaginal com espermatozoides em *M. l. diutius*, B) Detalhe dos espermatozoides no útero posterior e presença de secreção, C) Transição útero-infundíbulo com espermatozoides em *M. l. lemniscatus*, D) Detalhe dos espermatozoides no útero anterior armazenados em receptáculos, E) Útero com espermatozoides, F) Detalhe do espermatozoide próximo às células ciliadas do útero; S = espermatozoides, R = receptáculo, Li = luz do infundíbulo, Lu = luz do útero, Gm = glândula mucosa, Ce = cílios epiteliais, se = secreção, seta = bolha de espermatozoides.

3.3.5 Crescimento folicular

O estudo histológico dos folículos mostra diferenças morfológicas ligadas ao tamanho. Ao longo de seu crescimento incorporam vitelo que ocupa cada vez mais espaço, compactando o epitélio seminífero que o envolve. O vitelo muda seu formato, estando mais compacto nos folículos V1 e mais interpolado em folículos V2 (Tabela 7, Figura 35).

Tabela 7 - Medidas e aspecto dos folículos das *Micrurus* amazônicas

Tamanho do folículo (mm)	Tamanho do epitélio seminífero (mm)	Aspecto do vitelo
A) 5,25	67,4	Compacto
B) 10,08	53,0	Compacto
C) 17,6	7,4	Interpolado

Fonte: (COETI, 2016)

Figura 35 - Cortes de folículos de *Micrurus* da Amazônia

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: A) Folículo atrésico; B) Folículo em vitelogênese primária; C) Folículo em vitelogênese secundária; V = vitelo, ef = epitélio seminífero, t = teca, mv = membrana vitelínica, p = células piriformes, te = teca externa, ti = teca interna.

Figura 36 - Resumo de estratégias reprodutivas encontradas nas fêmeas e machos de *M. lemniscatus* da Amazônia

Fonte: (COETI, 2016).

Legenda: * = períodos de regressão.

3.4 DISCUSSÃO

As variações no tamanho do corpo em serpentes influenciam várias características da sua história de vida, como por exemplo, o tamanho dos ovos, o tamanho da prole, o tamanho da ninhada e a sobrevivência (FORD; SIEGEL, 1989). Não foram detectadas diferenças significativas no tamanho de machos e fêmeas para as *Micrurus lemniscatus* da Amazônia, porém em *M. l. lemniscatus* os machos possuem a cauda relativamente maior, com índice de dimorfismo sexual negativo, o que aproxima esta subespécie de outras espécies de tríades do Brasil, como *M. frontalis* e *M. altirostris* (MARQUES; PIZZATO; ALMEIDA-SANTOS, 2013). Já para *M. l. diutius* o tamanho da cabeça do macho é relativamente e significativamente maior que o da fêmea e o seu SSD é positivo, demonstrando que estas subespécies possuem algumas diferenças morfológicas, mesmo coexistindo no mesmo habitat (MARTINS, MOLINA, 2008).

A existência de combate entre machos nestas subespécies não foi confirmada, porém há ocorrência desse ritual para a subespécie da Mata Atlântica,

Micrurus l. carvalhoi, mesmo com o SSD positivo (MISSASSI et al., no prelo)³, o que gera expectativas desse comportamento também nas subespécies amazônicas.

Os machos alcançam a maturidade sexual em tamanhos menores que as fêmeas, como visto para outras *Micrurus* (QUINN, 1979; JACKSON; FRANZ, 1981; SOLÓRZANO; CERDAS, 1988; MARQUES, 1996). Para toda a amostra de *M. lemniscatus* da Amazônia, o menor macho maduro (461 mm) foi amostrado no mês de dezembro, possuindo 200 mm a mais de diferença do menor macho da amostra (261 mm), coletado também em dezembro, esta pode ser a taxa de crescimento relativo que os machos dessas duas subespécies possuem ao longo de 12 meses (QUINN, 1979).

A menor fêmea madura, com folículos em V2 evidenciados histologicamente como feito em Manes et al. (2007), foi também a menor fêmea de *Micrurus lemniscatus* deste trabalho a apresentar espermatozoides em seu oviduto, o que confirma o tamanho de maturidade para as fêmeas da espécie em torno de 468 mm.

Outro parâmetro que pode ser analisado através das datas de coleta dos exemplares de museus é o padrão de atividade que estes apresentam ao longo das estações (MARQUES, 1996; MARQUES; ALMEIDA-SANTOS; RODRIGUES, 2006). O gráfico de atividade sazonal para as *Micrurus lemniscatus* da Amazônia mostra valores maiores para ambas as subespécies na estação seca, sendo este período o de maior atividade para as *Micrurus* deste trabalho, ressaltando as diferenças existentes no padrão amazônico de atividade e no padrão da Mata Atlântica para este gênero (MARQUES; ALMEIDA-SANTOS; RODRIGUES, 2006).

Variações macroscópicas na anatomia do trato reprodutivo entre as duas subespécies não foram observadas, porém ao longo do ano ocorreram variações nos machos nos ductos deferentes, que em algumas estações estavam mais enovelados e volumosos e nas fêmeas nas pregas do infundíbulo posterior que ocupavam uma parte maior ou menor deste de acordo com a época do ano (SIEGEL et al., 2011; ALMEIDA-SANTOS et al., 2014).

A falta de variação significativa ao longo do ano para o volume testicular, diâmetro e epitélio dos túbulos seminíferos em *M. l. lemniscatus* condiz com o observado nas lâminas histológicas, os machos possuem atividade espermatogênica durante todo o ano. Foi observado somente um macho em regressão na estação

³ MISSASSI, A. F. R.; COETI, R. Z.; GERMANO, V. J.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. *Micrurus lemniscatus carvalhoi* (coral snake) male - male combat. Herpetological Review, 2016. No prelo.

chuvosa (dezembro), como ocorreu no estudo de Goldberg (2004), também com um único macho de *Micrurus nigrocinctus*, porém neste caso a regressão ocorreu na estação seca (março). Para *M. l. diutius* não foi observado nenhum testículo em regressão, porém isto pode estar relacionado ao baixo número de indivíduos analisados já que outros elapídeos americanos como *Micrurus nigrocinctus* (GOLDBERG, 2004), *Micruroides euryxanthus* (GOLDBERG, 1997) e *Micrurus fulvius* (QUINN, 1979) parecem apresentar o mesmo padrão, sendo assim é possível que os machos de *Micrurus lemniscatus* da Amazônia estejam em espermatogênese a maior parte do ano e entrem em regressão durante um período de tempo muito curto.

Para os parâmetros analisados a partir do rim direito em *M. l. lemniscatus* o único a ter diferença significativa foi o diâmetro do rim que se mostrou maior na estação seca, isto pode significar que, embora observe-se uma hipertrofia dos segmentos sexuais renais ao longo de todo ano na amostra, uma maior quantidade de SSRs hipertrofiados devem estar presentes nessa época para *M. lemniscatus* da Amazônia. Uma vez que a hipertrofia do SSR é coincidente à elevação de andrógenos no plasma e também ao período de maior espermatogênese em muitas espécies de serpentes (SCHUETT et al., 2002; SEVER et al., 2002; KROHMER, 2004), sugere-se que os machos estejam mais ativos na estação seca, informação também corroborada pelo período de maior atividade sazonal encontrado neste trabalho.

Os ductos deferentes apresentaram espermatozoides nas duas estações, não havendo diferenças significativas entre o tamanho do diâmetro ou epitélio (QUINN, 1979) entre as subespécies por estação, com exceção do mesmo espécime de *M. l. lemniscatus*. Esse macho apresentou regressão testicular, possuindo o ducto vazio no mês de dezembro, confirmando o fato de que este exemplar estava em regressão como o encontrado por Goldberg (2004).

As fêmeas de *Micrurus lemniscatus* da Amazônia não aparentam diferenças morfológicas entre si, a única variação morfológica é aquela que ocorre ao longo das estações, devido à vitelogênese que faz com que os folículos cresçam. Em alguns indivíduos o tamanho dos folículos influenciou a posição do infundíbulo que aparenta colapsar-se caudalmente, abrindo espaço para receber o folículo em V2 na ovulação (SIEGEL et al., 2011).

De acordo com o proposto por Manes et al. (2007), para o estudo da morfologia microscópica de folículos, em *Micrurus lemniscatus* os folículos só alcançam a vitelogênese secundária em tamanhos maiores que 10 mm.

A presença de espermatozoides no oviduto foi observada durante a estação seca em fêmeas das duas subespécies, ambas as fêmeas possuíam folículos em V2, porém a fêmea de *M. l. lemniscatus* foi a menor fêmea madura, com 468 mm de CRC e dois folículos vitelogênicos medindo cerca de 30 mm. Essa fêmea provavelmente estava em seu primeiro período reprodutivo, como observado para *Micrurus fulvius* por Jackson e Franz (1981). A fêmea de *M. l. diutius* apresentou folículos medindo por volta de 16,91 mm, este fato indica que os espermatozoides encontrados nela estavam estocados aguardando o crescimento folicular, o que sugere a estocagem de espermatozoides em fêmeas de *Micrurus lemniscatus* amazônicas, assim como visto para outras espécies de serpentes (SIEGEL et al., 2011; ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2015).

3.5 CONCLUSÕES

Os machos de *Micrurus lemniscatus lemniscatus* e *Micrurus lemniscatus diutius* apresentam ciclo reprodutivo similar, produzem espermatozoides durante todo o ano, porém o fato de haver um curto período de regressão em *M. l. lemniscatus* classifica seu ciclo como contínuo cíclico, o qual pode diferir do ciclo de *M. l. diutius* por não apresentar, até o momento, regressão específica da linhagem espermatogênica. Porém, comparando-se a outros padrões encontrados em *Micrurus* é certo afirmar que este ciclo seja também contínuo cíclico.

As fêmeas de *Micrurus lemniscatus lemniscatus* e *Micrurus lemniscatus diutius* possuem seu período de vitelogênese na estação seca, podendo se estender até o começo da estação chuvosa em *M. l. lemniscatus*. Na estação seca as fêmeas encontram-se receptivas e podem estocar espermatozoides caso ainda não possuam folículos em vitelogênese secundária suficientemente grandes para a fecundação. Levando em consideração a duração extensa do período de vitelogênese, nesta espécie o ciclo reprodutivo das fêmeas é classificado como estendido.

A análise separada dos ciclos das duas subespécies possibilitou a conclusão de que são ciclos muito semelhantes, não havendo até o momento diferenças reprodutivas suficientes que embasem a separação dessas subespécies em espécies diferentes. Assim o ciclo reprodutivo de *Micrurus lemniscatus* da Amazônia é sazonal sincrônico.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; BRAZ, H. B.; SANTOS, L. C.; SUEIRO, L. R.; BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; KASPEROVICZUS, K. N. Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados. **Herpetologia Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 14-24, 2014.
- BARRIO-AMORÓS, C. L.; CALCAÑO, D. First record of *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758) from western Venezuela with comments on coral snakes from the eastern Andean piedmont. **Herpetozoa**, v. 16, n. 1-2, p. 73-78, 2003.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of the Western hemisphere**. Ithaca, U.S.A.: Comstock Publishing Associates, v. 1, p. 476, 2004.
- CUNHA, O. R.; NASCIMENTO, F. P. Ofídios da Amazônia X—as cobras da região leste do Pará. **Publicações do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 83, p. 218, 1993.
- DA SILVA, M. V.; DE SOUZA, M. B.; BERNARDE, P. S. Riqueza e dieta de serpentes do Estado do Acre, Brasil. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 12, n. 2, p. 165-176, 2010.
- DE SOUSA, K. R. M.; PRUDENTE, A. L. C.; MASCHIO, G. F. Reproduction and diet of *Imantodes cenchoa* (Dipsadidae: Dipsadinae) from the Brazilian Amazon. **Zoologia** (Curitiba), v. 31, n. 1, p. 8-19, 2014.
- DOWLING, H.G. A proposed standard system of counting ventrals in snakes. **British Journal of Herpetology**, v. 1, p. 97–99, 1951.
- DUELLMAN, W. E. **The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador**. Lawrence: University of Kansas, 1978.
- FORD, N. B.; SEIGEL, R. A. Relationships among body size, clutch size, and egg size in three species of oviparous snakes. **Herpetologica**, p. 75-83, 1989.
- GOLDBERG, S. R. Notes on reproduction in the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes: Elapidae) from Costa Rica. **Caribbean Journal of Science**, v. 40, n. 3, p. 420-422, 2004.
- GOLDBERG, S. R. Reproduction in the western coral snake, *Micruroides euryxanthus* (Elapidae), from Arizona and Sonora, Mexico. **The Great Basin Naturalist**, v. 57, n. 4, p. 363-365, 1997.

- GOULDING, M.; CARVALHO, M. L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, *Characidae*): an important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, n. 2, p. 107-133, 1982.
- JACKSON, D. R.; FRANZ, R. Ecology of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) in northern peninsular Florida. **Herpetologica**, v. 37, p. 213-228, 1981.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical Journal**, v. 11, p. 447-455, 1979.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; SILVA, A. C. D.; ASSIS, M. D. G. P. D. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias Estratégicas**, v. 6, n. 12, p. 20-41, 2010.
- KROHMER, R. W. Variation in seasonal ultrastructure of sexual granules in the renal sexual segment of the northern water snake, *Nerodia sipedon sipedon*. **Journal of Morphology**, v. 261, n. 1, p. 70-80, 2004.
- KUBITZKI, K. The ecogeographical differentiation of Amazonian inundation forests. **Plant Systematics and Evolution**, v. 162, n. 1-4, p. 285-304, 1989.
- LEITÃO-FILHO, H. F. Considerações sobre a florística de florestas tropicais e subtropicais do Brasil. **IPEF**, v. 35, p. 41-46, 1987.
- MANES, M. E.; NORIEGA, T.; CAMPOS CASAL, F.; APICHELA, S. Ovarian changes during the reproductive cycle of the *Tupinambis merianae* lizard raised in a temperate environment. **Cuadernos de Herpetologia**, v. 21, n. 1, p. 21-29, 2007.
- MARQUES, O. A. V. Reproduction, seasonal activity and growth of the *Micrurus corallinus* (Serpentes, Elapidae). **Amphibia Reptilia**, v.17, p. 277-285, 1996.
- MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; RODRIGUES, M. G. Activity patterns in coral snakes, genus *Micrurus* (Elapidae), in south and Southeastern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 1, n. 2, p. 114-120, 2006.
- MARQUES, O. A. V.; PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive Strategies of New World Coral Snakes, Genus *Micrurus*. **Herpetologica**, v. 69, n. 1, p. 58-66, 2013.
- MARTINS, M.; ARAÚJO, M. S.; SAWAYA, R. J.; NUNES, R. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of neotropical pitvipers (*Bothrops*). **Journal of Zoology**, v. 254, p. 529-38, 2001.
- MARTINS, M.; MOLINA, F. B. Panorama geral dos répteis ameaçados do Brasil. In: **MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: MMA; Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008. v. 1, p. 327-334, 2008. (Biodiversidade, 9).

MARTINS, M.; OLIVEIRA, M. E. Natural history of snakes in forests of the Manaus region, Central Amazonia, Brazil. **Herpetological Natural History**, v. 6, n. 2, p. 78-150, 1998.

MATHIES, T. Reproductive cycles of tropical snakes. In: In: JUSTIN, L.; RHEUBERT, D. S. S.; STANLEY, E. T. **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. New Hampshire: Science Publishers, Enfield. Chap. 6, p. 511-550, 2014.

MIRANDA, J. P.; ANDRADE, G. V. Seasonality in diet, perch use, and reproduction of the gecko *Gonatodes humeralis* from eastern Brazilian Amazon. **Journal of Herpetology**, v. 37, n. 2, p. 433-438, 2003.

PIRES, M. G. **Revisão Taxonômica do complexo *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Elapidae)**. 2011. 39 f. Tese (Doutorado em Ciências, Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PLEGUEZUELOS, J. M.; FERICHE, M. Reproductive ecology of the horseshoe whip snake *Coluber hippocrepis* in the Iberian Peninsula. **Journal of Herpetology**, v. 33, n. 2, p. 202-207, 1999.

QUINN, H. R. Reproduction and growth of the Texas coral snake (*Micrurus fulvius tenere*). **Copeia**, v. 1979, n. 3, p. 453-463, 1979.

RASBAND, W. **ImageJ 1.46r**. National institute of health, USA, 2011. Disponível em: < <http://imagej.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 07 maio 2016.

ROJAS, C.; BARROS, V. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Sperm storage and morphofunctional bases of the female reproductive tract of the snake *Philodryas patagoniensis* from southeastern Brazil. **Zoomorphology**, v. 134, n. 4, p. 577-586, 2015.

ROZE, J. A. **Coral snakes of the Americas: biology, identification, and venoms**. Malabar, Florida: Krieger Publishing Company, 1996.

SCHUETT, G. W.; CARLISLE, S. L.; HOLYCROSS, A. T.; O'LEILE, J. K.; HARDY, D. L.; VAN KIRK, E. A.; MURDOCH, W. J. Mating system of male Mojave rattlesnakes (*Crotalus scutulatus*): seasonal timing of mating, agonistic behavior, spermatogenesis, sexual segment of the kidney, and plasma sex steroids. In: SCHUETT, G. W.; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENER, H. W. **Biology of the vipers**. Utah, USA: Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountainp. 2002. 515-532.

SEVER, D. M.; STEVENS, R. A.; RYAN, T. J.; HAMLETT, W. C. Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). III. Sexual segment of the male kidney. **Journal of Morphology**, v. 252, p. 238-254, 2002.

SIEGEL, D. S.; MIRALLES, A.; CHABARRIA, R. E.; ALDRIDGE, R. D. Female reproductive anatomy: cloaca, oviduct, and sperm storage. In: JUSTIN, L.; RHEUBERT, D. S. S.; STANLEY, E. T. **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. New Hampshire: CRC Press. Chap. 6, p. 347-409, 2014.

SILVA, K. M. P. **Biologia reprodutiva da jararaca da Amazônia, *Bothrops atrox* (Serpente: Viperidae)**. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SILVA JR., N.J.; SITES JR., J. W. Phylogeny of South American triad coral snakes (Elapidae: *Micrurus*) based on molecular characters. **Herpetologica**, v. 57, n. 1, p. 1-22, 2001.

SOLÓRZANO, A.; CERDAS, L. Ciclos reproductivos de la serpiente coral *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes: Elapidae) en Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v. 36, n. 2A, p. 235-239, 1988.

SOLÓRZANO, A.; CERDAS, L. Biología reproductiva de la cascabel centroamericana *Crotalus durissus durissus* (Serpentes: Viperidae) en Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v. 36, n. 2A, p. 221-6, 1988.

VITT, L. J.; BLACKBURN, D. G. Ecology and life history of the viviparous lizard *Mabuya bistrata* (Scincidae) in the Brazilian Amazon. **Copeia**, v. 1991, n. 4, p. 916-927, 1991.

WIKELSKI, M.; HAU, M.; WINGFIELD, J. C. Seasonality of reproduction in a neotropical rain forest bird. **Ecology**, v. 81, n. 9, p. 2458-2472, 2000.

ZAR, J. R. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, p. 875, 1999.

4 CONCLUSÕES GERAIS

A comparação entre os ciclos reprodutivos de *Micrurus lemniscatus carvalhoi* da Mata Atlântica e Cerrado e *Micrurus lemniscatus* da Floresta Amazônica evidencia que estes apresentam diferenças consideráveis. As fêmeas de *Micrurus lemniscatus carvalhoi* possuem um período restrito de vitelogênese enquanto as amazônicas mostram um período estendido desse processo. Os machos de *M. l. carvalhoi* apresentam pico de produção espermática em uma estação, enquanto que os machos amazônicos produzem espermatozoides durante o ano todo, com um curto período de regressão. Porém a cópula em *M. l. carvalhoi* ocorre no outono e inverno e a cópula em *M. lemniscatus* se estende durante a estação seca, ocorrendo, portanto, em meses coincidentes. Assim, é provável que o habitat esteja influenciando o ciclo dessas subespécies, alongando o período dos eventos reprodutivos nas amazônicas, o que pode gerar uma barreira reprodutiva e futura especiação entre elas.