

LETÍCIA RUIZ SUEIRO

**CUSTOS REPRODUTIVOS EM *CROTALUS DURISSUS*
(SERPENTES, VIPERIDAE) DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2013

LETÍCIA RUIZ SUEIRO

**CUSTOS REPRODUTIVOS EM *CROTALUS DURISSUS*
(SERPENTES, VIPERIDAE) DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dra. Selma Maria de Almeida-Santos

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Sueiro, Letícia Ruiz.

Custos reprodutivos em *Crotalus durissus* (Serpentes, Viperidae) do Estado de São Paulo, Brasil / Letícia Ruiz Sueiro. -- São Paulo, 2013.

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

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Cursos reprodutivos em Squamata.

Versão do título para o inglês: Reproductive costs in *Crotalus durissus* (Snakes, Viperidae) from São Paulo, Brazil.

1. Zoologia 2. Biologia Animal 3. Fisiologia Animal 4. Reprodução Animal 5. Répteis 6. Serpentes I. Almeida-Santos, Profa. Dra. Selma Maria de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT III. Título.

ICB/SBIB050/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Letícia Ruiz Sueiro.

Título da Tese: Custos reprodutivos em *Crotalus durissus* (Serpentes, Viperidae) do Estado de São Paulo, Brasil.

Orientador(a): Profa. Dra. Selma Maria de Almeida-Santos.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

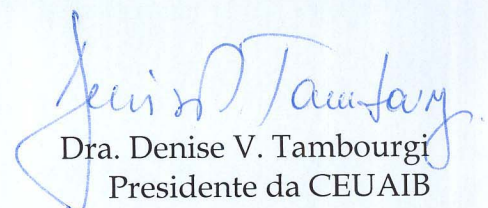
CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Custos reprodutivos em *Crotalus durissus* (Serpentes, Viperidae) do Estado de São Paulo, Brasil", protocolo nº 486/08, sob a responsabilidade de Selma Maria Almeida Santos e Leticia Ruiz Sueiro, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 11/06/2008.

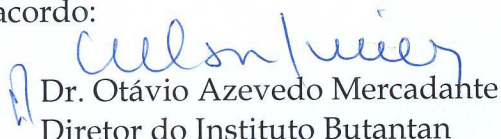
We certify that the Research entitled "Costs of reproduction in *Crotalus durissus* (Snakes, Viperidae) of the State of São Paulo, Brazil", protocol nº 486/08, under the responsibility of Selma Maria Almeida Santos and Leticia Ruiz Sueiro, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 06/11/2008.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
02/2008 – 02/2011	96 / serpente – <i>Crotalus durissus</i> (adulto)

São Paulo, 19 de junho de 2008.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

*Às minhas avós: Vó
Tica e Vó Dita, pelo
exemplo de força e de fé*

AGRADECIMENTOS

À querida Selma pela orientação, pela confiança, pela sabedoria em conduzir e incentivar a minha vida acadêmica e pelas conversas infindas sobre a vida e acima de tudo pelo exemplo de ser humano que propaga.

Ao diretor do Laboratório de Ecologia e Evolução – LEEV do Instituto Butantan Otávio A. V. Marques pela visão estratégica em conduzir a gestão do laboratório.

Aos integrantes do Grupo de Estudos de Reprodução em Squamatas - GERES pelas valiosas trocas de informações sobre as estratégias reprodutivas adotadas por inúmeras espécies de serpentes, lagartos e anfisbenas; pelas experiências compartilhadas durante os anos de convivência, pelo auxílio ao longo da elaboração desse projeto e pelos projetos que certamente ainda conduziremos.

Aos os alunos e estagiários do Laboratório de Ecologia e Evolução – LEEV do Instituto Butantan pela satisfação em trabalhar em equipe.

Aos funcionários do Laboratório de Ecologia e Evolução – LEEV do Instituto Butantan pela ajuda na logística para a execução deste trabalho.

Ao Valdir José Germano pelos ensinamentos transmitidos desde os tempos em que eu era estagiária FUNDAP, por facilitar minhas coletas e pelos valores de uma amizade.

Ao Laboratório VETPAT pela confecção das lâminas histológicas e pela confiança no projeto. À Dr^a. Renata Guimarães e a Me. Aline D'Olio do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA) do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo pela parceria, disponibilidade e experiência transmitidas que possibilitaram a obtenção dos dados de extração e quantificação de lipídeos e proteínas dos tecidos das *Crotalus durissus*.

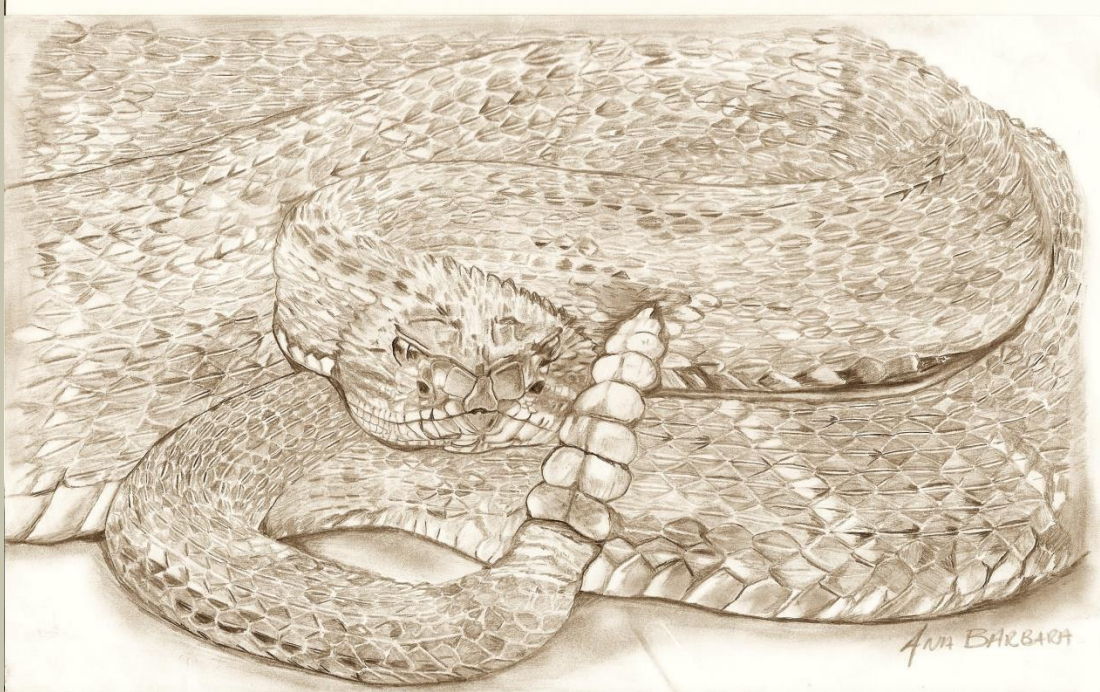
À minha família - Ruiz/Sueiro/Moraes/Lopes pela paciência e pelo apoio durante essa empreitada.

Aos meus pais pelo incentivo, pela liberdade e, sobretudo por proporcionarem uma infância livre de amarras e cheia de encantamentos.

À amiga Ana Bárbara Barros pelo vínculo nessa vida e certamente em outras tantas vidas.

À querida Dani Gennari pela paciência em me auxiliar com a coleta dos dados, pela valiosa amizade conquistada ao longo dos anos, pela força, serenidade e pelo inestimável carinho a mim doado.

E, por fim, mas não menos importantes, às serpentes, em especial às cascavéis brasileiras, pela oportunidade de entendê-las um pouco melhor.



A COBRA

*Certo ninguém prevê, nem ao menos suspeita,
Mas esse tronco anoso, ulcerado de galha,*

*De alguma árvore umbrosa, outrora ao bem afeita,
Hoje, abrigo do mal, uma cobra agasalha.*

*Ninguém supõe talvez que, além da fenda estreita
Que a cortiça apresenta, o roaz cupiz trabalha,
Formando a escura toca, onde se oculta à espreita
A cauta cascavel, que os crótalos chocalha...*

*É um velho esconderijo, a serpe ali se acoita
E só sai quando o sol, no alto, abrasando, brilha;
E indolente, ao calor, busca a primeira moita...*

*Adormece... Modorra... E a um susto, entre a serrilha
Dos dentes salta a língua; acorda e, ágil e afoita,
De arremesso se enrosca em rápida rodilha.*

Da Costa e Silva

RESUMO

SUEIRO, L. R. **Custos reprodutivos em *Crotalus durissus* (Serpentes, Viperidae) do Estado de São Paulo, Brasil.** 2013. 103 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A reprodução é custosa para ambos os sexos, mas a magnitude dos gastos e sua relação com o sucesso reprodutivo difere substancialmente entre machos e fêmeas. Os custos reprodutivos podem ser divididos em duas categorias: custos associados à sobrevivência e custos energéticos. Os custos associados à sobrevivência são aqueles que interferem na probabilidade de sobrevivência de organismos reprodutivos. Os custos associados à fecundidade influenciam a energia disponível para o futuro evento reprodutivo de um organismo. *Crotalus durissus* possui um ciclo reprodutivo sazonal, no qual o início da deposição de vitelo nos folículos ovarianos ocorre no fim do verão. A cópula ocorre no outono, a estocagem de espermatozoide se estende durante inverno, o término da deposição de vitelo nos folículos ovarianos e a fertilização acontecem na primavera e, por fim, a parturição é observada ao final no verão. Os machos exibem competição intraespecífica evidenciada em rituais de combate com a finalidade de acessar fêmeas receptivas que liberam partículas de feromônios (vitelogenina) no ar. A inferência de custos reprodutivos associados à sobrevivência foi realizada por meio de levantamentos das taxas de atividade entre machos e fêmeas como parâmetro indicativo de maior risco de mortalidade. Fêmeas requerem um investimento energético para darem início ao período reprodutivo. Os lipídeos provenientes do estoque de corpos de gordura abdominal são acumulados no fígado e consumidos durante o ciclo dos folículos ovarianos e esta é a fase mais custosa da reprodução, quando ocorre a transformação da gordura abdominal em vitelo. A variação da quantidade de gordura abdominal e dos substratos energéticos do fígado e dos rins foi avaliada para mensurar o custo energético da reprodução em *C. durissus*. Os resultados obtidos nesse trabalho revelam que as estratégias reprodutivas adotadas por fêmeas *C. durissus* exigem um alto investimento energético – evidenciado pelos maiores níveis de gordura abdominal e de lipídeos no fígado durante a fase vitelogênica, que são utilizados para custear a sinalização do estro na estação reprodutiva, a ovulação e durante toda a prenhez para nutrir os embriões. Além disso, o padrão de atividade diferenciada entre machos e fêmeas que as táticas reprodutivas exercidas pelos machos, durante o outono, elevam a taxa de avistamento, pois durante essa estação, os machos realizam a procura prolongada pela fêmea, combate e cópula. Para o padrão encontrado na primavera e verão, o maior número de fêmeas pode estar relacionado ao processo vitelogênico e a prenhez, fatores que incrementam a massa corpórea, aumentam a taxa de termorregulação, consequentemente, tornando-as menos hábeis para escapar de predadores, sendo então mais avistadas. Durante o inverno, o resultado pode ser atribuído às menores temperaturas recorrentes durante a estação, forçando, machos e fêmeas a permanecerem em abrigos para diminuir os gastos com deslocamentos, dada a condição ectotérmica dos répteis.

Palavras-chave: Serpentes. Custo reprodutivo. Sobrevivência. Gordura abdominal. Cascavéis.

ABSTRACT

SUEIRO, L. R. **Reproductive costs in *Crotalus durissus* (Serpentes, Viperidae) from São Paulo State, Brazil.** 2013. 103 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Reproduction is costly for both sexes, but the magnitude of spending and the relation to reproductive success differs substantially between males and females. Reproductive costs can be divided into two categories: costs associated with survival and energy costs. The costs associated with survival are those that affect the probability of survival of reproductive organisms. Costs associated with fertility influence the energy available for future reproductive event. *Crotalus durissus* has a seasonal reproductive cycle in which the beginning of the yolk deposition in ovarian follicles occur in the late summer, and mating occur in autumn, the sperm storage extends during winter the end of yolk deposition in ovarian follicles and fertilization occurs in spring. Finally, the birth is observed at the late summer. Males exhibit intraspecific competition evidenced in ritual combat with the purpose of access to receptive females release pheromones particles (vitellogenin) in the air. The inference of reproductive costs associated with survival was accomplished through surveys of activity rates between males and females, as na indicative of higher mortality risk. Females require a high energy investment to initiate the reproductive period. Lipids from the abdominal fat accumulates in the liver and are consumed during the cycle of ovarian follicles and this is the most costly phase of reproduction, when abdominal fat is shifted in yolk. The variation of the amount of abdominal fat and energetics substrates liver and kidneys were evaluated to measure the energy cost of reproduction in *C. durissus*. The results of this study shows that the reproductive strategies adopted by females *Crotalus durissus* require a high energy investment - evidenced by the higher levels of abdominal fat and lipids in the liver during vitellogenic phase, which are used to signal estrus in the reproductive season, ovulation and throughout pregnancy to nourish the embryos. Moreover, the pattern of activity differentiated between males and females reproductive tactics adopted by males during autumn, increase the rate of sighting, because during this season, the males perform a prolonged search by females, fighting and mating. For the pattern found in spring and summer, many females may be related to pregnancy and vitellogenic process, factors that increase body mass, and the thermoregulation rate, thus making them less able to escape predators, and then more sighted. During the winter, the result can be attributed to lower temperatures during this season, forcing males and females to remain in shelters to decrease moviments spending, given the ectothermic condition in reptiles.

Keywords: Snakes. Reproductive cost. Survival. Abdominal fat. Rattlesnakes.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CUSTO ENERGÉTICO DA REPRODUÇÃO EM *CROTALUS DURISSUS* (SERPENTES, VIPERIDAE), DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

1.1 Introdução.....	12
1.2 Material e Métodos.....	16
1.2.1 Obtenção das amostras.....	16
1.2.2 Dissecção dos espécimes.....	16
1.2.3 Análises histológicas.....	17
1.2.4 Extração dos lipídeos totais do fígado e dos rins.....	18
1.2.5 Quantificação dos lipídeos do fígado e dos rins.....	18
1.2.6 Extração de proteínas totais do fígado.....	19
1.2.7 Quantificação das proteínas totais do fígado.....	19
1.2.8 Análises estatísticas.....	20
1.3 Resultados.....	20
1.3.1 Proporção de machos e fêmeas reprodutivos e não reprodutivos.....	20
1.3.2 Parâmetros ponderais e morfométricos – fêmeas.....	21
1.3.3 Substratos energéticos – fêmeas.....	24
1.3.4 Ciclo reprodutivo – fêmeas.....	26
1.3.5 Parâmetros ponderais e morfométricos – machos.....	28
1.3.6 Substratos energéticos – machos.....	30
1.3.7 Ciclo testicular – volume.....	32
1.3.8 Ciclo testicular – histologia.....	32
1.3.9 Alterações hepáticas.....	34
1.3.10 Descrição da estrutura macroscópica e microscópica do fígado.....	34
1.3.11 Alterações histológicas do tecido hepático das fêmeas.....	37
1.3.12 Alterações histológicas do tecido hepático das machos.....	39
1.3.13 Alterações renais.....	41
1.3.14 Descrição da estrutura macroscópica e microscópica dos rins.....	42
1.3.15 Alterações histológicas dos rins dos machos.....	45
1.3.16 Alterações histológicas dos rins das fêmeas.....	47
1.4 Discussão.....	49
1.4.1 Proporção de indivíduos reprodutivos.....	49
1.4.2 Ciclos reprodutivos.....	50

1.4.3	<i>Alocação de energia para a reprodução</i>	52
1.4.4	<i>Gordura Abdominal</i>	55
1.4.5	<i>Fígado – Lipídeos, proteínas e alterações histológicas</i>	57
1.4.6	<i>Rins – Lipídeos e segmento sexual renal</i>	61

CAPÍTULO 2 – A SAZONALIDADE REPRODUTIVA DE *CROTALUS DURISSUS* (SERPENTES, VIPERIDAE) IMPÕE UM CUSTO REPRODUTIVO DIFERENCIADO ENTRE MACHOS E FÊMEAS?

2.1	Introdução	64
2.2	Material e Métodos	68
2.2.1	<i>Dados da Recepção de Serpentes do Instituto Butantan</i>	68
2.2.2	<i>Dados dos registros de acidentes crotálicos – Hospital Vital Brazil</i>	68
2.2.3	<i>Dados climáticos</i>	69
2.2.4	<i>Análises estatísticas</i>	69
2.3	Resultados	70
2.3.1	<i>Dados climáticos</i>	70
2.3.2	<i>Padrão de atividade sazonal</i>	71
2.3.3	<i>Padrão de atividade – machos e fêmeas</i>	73
2.3.4	<i>Sazonalidade dos acidente crotálicos</i>	76
2.4	Discussão	80
3	CONCLUSÕES GERAIS	88
	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICE – Esquema representativo da mobilização dos substratos energéticos em fêmeas de <i>C. durissus</i> ao longo dos estágios reprodutivos	103

CAPÍTULO 1 - CUSTO ENERGÉTICO DA REPRODUÇÃO EM *CROTALUS DURISSUS* (SERPENTES, VIPERIDAE), DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

1.1 Introdução

A ligação entre o balanço de energia e reprodução decorre do princípio unificador da biologia, a teoria sintética da evolução. Os mecanismos fisiológicos observados nas populações viventes são resultado da ação da seleção natural na variação genética aleatória das populações ancestrais. Assim, os mecanismos de controle do consumo e do armazenamento de energia existem porque estes mecanismos foram herdados e permitiram a sobrevivência dos organismos até a maturidade sexual, conferindo então uma vantagem reprodutiva (DERICKSON, 1976; SCHNEIDER, 2004).

Durante a evolução recente dos organismos, a habilidade de estocar quantidades significativas de energia dentro e fora do corpo, permitiu o engajamento em outras atividades que possibilitaram o sucesso reprodutivo. Assim, a habilidade de monitorar a energia externa (disponibilidade de presas) e interna (estoque de gordura abdominal, por exemplo) disponíveis são o elo central entre balanço energético e a reprodução. Tal habilidade permitiu aos animais priorizarem suas opções comportamentais de acordo com as flutuações das condições energéticas e reprodutivas (SCHNEIDER, 2004).

Sabe-se que em animais, os recursos para suprir as demandas das variações dos aspectos da história natural – crescimento, sobrevivência e reprodução - são estocados sob diferentes formas bioquímicas (POND, 1981; SANTOS; LLORENTE, 2004). Nos vertebrados, a forma mais recorrente de estocagem de energia é representada pela reserva de gordura, muito relevante também para hibernação e migração (SANTOS; LLORENTE, 2001, 2004).

Embora para muitos lagartos a cauda seja um importante órgão de armazenamento de gordura, como observado em *Mabuya dissimilis* e em *Morethia bouleneri* (CHAPPLE; SWAIN, 2002), para as serpentes, a forma mais ostensiva de reservas energéticas, é encontrada nos estoques de gordura abdominal. Os corpos de gordura abdominal possuem concentrações elevadas de lipídeos, os quais constituem biomoléculas de alto valor calórico (9 kcal/g), torando-os eficientes fontes de reserva energética para subsidiar inúmeros processos metabólicos dentre os organismos (SCHERIDAN, 1994).

As serpentes, bem como outros animais ectotérmicos, são classificadas como “capital breeders” – não se reproduzem até acumularem energia suficiente para custear a reprodução;

ou seja, há uma dissociação temporal para a aquisição de energia e o período reprodutivo (BONNET et al., 1998).

Assim sendo, em muitas espécies de serpentes, as fêmeas requerem um investimento energético para darem início ao período reprodutivo (SIEGEL; FORD, 1987), e em viperídeos, a reprodução ocorre em anos alternados, e em alguns casos uma vez a cada três anos ou mais (ALMEIDA-SANTOS, 2000; DILLER; WALLACE, 1984).

Muitos pesquisadores têm questionado que bienalidade na reprodução das fêmeas de serpentes seja determinada geneticamente e sugeriram que a frequência reprodutiva ocorre em função reservas de gordura disponíveis (ALDRIDGE, 1979; BLEM, 1982; BROWN, 1991; MACARTNEY; GREGORY, 1988; WHITTIER; CREWS, 1990). Esse é o padrão descrito para as *Viperas aspis*, cuja frequência reprodutiva é determinada principalmente por uma combinação de fatores como a disponibilidade de alimentos, as reservas de gordura, duração da estação reprodutiva e estrutura populacional (BLEM, 1982; SEIGEL; FORD, 1987).

Em vertebrados ectotérmicos, a quantidade de gordura está relacionada ao metabolismo das gônadas. Os lipídeos provenientes do estoque de corpos de gordura abdominal são acumulados no fígado e consumidos durante o ciclo dos folículos ovarianos (BONNET, 2011; JANEIRO-CINQUINI et al., 1995; TELFORD, 1970) e esta é a fase mais custosa da reprodução, quando o vitelo é depositado nos folículos por meio da transformação da gordura do corpo mediada pela vitelogenina (CREWS; GARSTKA, 1982).

A utilização da gordura abdominal para a vitelogênese já foi relatada para várias espécies de serpentes (ALDRIDGE et al., 2003; BONNET, 2011; MATHIES, 2011; PRESTT, 1971; TINKLE, 1962). Essa mudança metabólica no tecido adiposo ocorre no fígado. Então há de se esperar que em espécies com ciclo reprodutivo sazonal, o fígado metabolize os lipídeos durante a fase reprodutiva (vitelogênica). E esse processo pode ser detectado pelas variações morfológicas do fígado evidenciado pela variação do número de vacúolos indicativos de deposição de lipídeos e um aumento da massa do fígado como foi observado antes da ovulação em *Trimeresurus flavoviridis* (YOKOYAMA; YOSHIDA, 1994).

Entretanto, em serpentes com período reprodutivo prolongado – aproximadamente nove meses de vitelogênese secundária, as alterações morfológicas do fígado são menos evidentes, provavelmente por que há produção de vitelo durante a maior parte do ano (FOWLER, 1989). Esse fenômeno foi observado também em *Waglerophis merremii*, *Xenodon newiedii* (PIZZATO; JORDÃO; MARQUES, 2008) e *Tomodon dorsatus*

(BIZERRA; MARQUES; SAZIMA, 2005) espécies que apresentam período vitelogênico prolongado.

A vitelogenina ainda é responsável pela sinalização do estro nas fêmeas. Essa lipofosfoproteína é disponibilizada na corrente sanguínea durante a fase vitelogênica e é permeada entre as escamas atuando como um feromônio para atrair e estimular os comportamentos sexuais dos machos. Logo após ecdise de fêmeas reprodutivas, essa sinalização torna-se mais evidente; fato comprovado pela observação de cópulas entre machos e fêmeas que trocaram de pele recentemente (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; BROWN, 1995; MARQUES et al., 2009; SHUETT, 1992).

Madsen et al. (1993) relatam para *Vipera berus*, que o sucesso da cópula (número de cópula por machos) aumenta com a distância percorrida pelos machos. A taxa de movimentação dos machos durante o período reprodutivo aumenta em relação ao período não reprodutivo (PRESTT, 1971; SECOR, 2002). Esse esforço de procura pode ser custoso em termos energéticos para os machos (ALDRIDGE; DUVALL, 2002). Em *Coluber viridiflavus* o índice de condição corpórea (medida da gordura estocada) diminuiu drasticamente durante o período reprodutivo (BONNET; NAULLEAU, 1996).

Além dos custos energéticos impostos pela procura ativa de fêmeas, os machos também se alimentam menos durante a estação reprodutiva, como observado por Martin (1992) em *Crotalus horridus*. Dentro do repertório reprodutivo dos machos de algumas espécies de serpentes, há competição intrasexual, na forma de rituais de combate, fato que incrementa os custos energéticos e de sobrevivência dos machos associados ao período reprodutivo (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; CARPENTER, 1984; PIZZATTO et al., 2006).

O ciclo reprodutivo masculino pode ser inferido pelo aumento do comprimento, do volume e da massa dos testículos, que reflete a intensa atividade espermatogênica (SCHUETT, 2002). Há relatos de que o gasto energético para a produção dos gametas masculinos não é trivial, refletido por uma considerável perda de massa corpórea durante o período de espermatogênese (OLSSON; MADSEN; SHINE, 1997).

Além da produção de gametas, machos de serpentes podem desenvolver caracteres sexuais secundários (ALDRIDGE; DUVALL, 2002). O mais evidente caracter sexual secundário é o segmento sexual renal (SSR), que constitui-se de uma parte dos túbulos contorcidos distais do néfron, presente em de répteis squamatas. Essa estrutura é estimulada por hormônios esteróides, que propiciam a síntese de grânulos de secreção eosinofílica (SEVER et al., 2002). Geralmente, a atividade espermatogênica é concomitante ao aumento do SSR durante a época reprodutiva (KROHMER, 2004; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS,

2008). Entretanto, a avaliação das alterações do SSR e do volume testicular das cascavéis neotropicais nunca foram realizadas até então, deixando assim, uma lacuna na compreensão integrada do ciclo reprodutivo dos machos com as demandas energéticas requeridas durante o processo reprodutivo.

Tais exigências comportamentais e fisiológicas vivenciadas por machos e fêmeas de serpentes viperídeas requerem grande consumo de energia disponível em estoques de gordura adquiridos ao longo do período não reprodutivo, entretanto, essa hipótese tem recebido pouca atenção para as espécies tropicais (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; ALDRIDGE et al., 2003; MATHIES, 2011).

Serpentes são modelos excelentes para analisar as implicações do estoque de gordura no metabolismo, pois para esse grupo de répteis, a evolução favoreceu a estocagem de gordura com “combustível” para o esforço reprodutivo. Além disso, serpentes apresentam uma plasticidade reprodutiva considerável, permitindo testar a dinâmica de lipídeos no contexto reprodutivo. (BEAUPRE; DUVALL, 1998; POUHG, 1980; SEIGEL; FORD, 1987).

A relação entre a quantidade de reserva energética (gordura abdominal) e o “output” reprodutivo é muito complexa e varia entre as espécies (AUBRET et al., 2002). No entanto, comparações dos estoques de gordura abdominal antes e depois da reprodução em serpentes têm sido relatadas na literatura mais recentemente (MADSEN; SHINE, 2000; SANTOS; LLORENTE, 2004; SHINE; MASON, 2005) e é óbvio que os organismos não podem reproduzir-se na ausência total de reservas energéticas (FRISH, 1978), porém o custo energético da reprodução ainda não foi pesquisado para nenhuma espécie neotropical.

A espécie *Crotalus durissus* neotropical apresentam-se como uma das espécies mais intensivamente estudadas sob o contexto ecológico e da história natural, destacando-se como um potencial modelo para as interpretações evolutivas das estratégias reprodutivas (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; ALMEIDA-SANTOS, 2005; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; BEAUPRE; DUVALL, 1998). As fêmeas de *Crotalus durissus* reproduzem por viviparidade e apresentam um ciclo reprodutivo marcadamente sazonal, no qual o início da deposição de vitelo nos folículos ovarianos ocorre no fim do verão. A cópula ocorre no outono, a estocagem de espermatozoides se estende durante inverno. O término da deposição de vitelo nos folículos ovarianos e a fertilização acontecem na primavera e, por fim, a parturição é observada ao final no verão (ALMEIDA-SANTOS, 2005). Esta sequência de eventos pode ser avaliada sazonalmente.

Dessa forma o objetivo desse trabalho é avaliar o ciclo de gordura, as alterações morfológicas do fígado, dos rins e a mensuração dos substratos energéticos utilizados durante

os principais eventos reprodutivos de *Crotalus durissus*. Além disso, disponibilizar pela primeira vez, dados fundamentais para a compreensão das necessidades energéticas de um dos aspectos mais relevantes da história de vida de serpentes.

1.2 Material e métodos

1.2.1 Obtenção das amostras

Sob o protocolo de aprovação nº 486/08 da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB), as *Crotalus durissus* provenientes do Estado de São Paulo, foram cedidas pela Recepção do Laboratório de Herpetologia.

Durante dois anos, ao longo das estações, uma média de 12 machos e 12 fêmeas de *Crotalus durissus* recém chegados à Recepção de Serpentes, foram retidos para dissecação ventral e inferência de dados reprodutivos por meio do exame das gônadas e a coleta dados biométricos. Foram considerados para este estudo, apenas indivíduos adultos.

1.2.2 Dissecação dos espécimes

Os espécimes foram pré anestesiados em câmara de Dióxido de Carbono (CO₂) durante 5 minutos e posteriormente foram eutanasiados com Thiopentax (Tiopental Sódico). Foram coletados dados de CRC (comprimento rostro cloacal), CC (comprimento caudal) e massa corpórea utilizando uma trena e uma balança Filizzola® (escala 10 g – 10 Kg).

Após a coleta dos dados morfométricos externos, uma incisão ventral foi realizada para a coleta dos dados referentes ao estágio reprodutivo dos machos e fêmeas:

Machos: observação do ducto deferente na sua porção mais distal: opaco e enovelado, indicando presença de espermatozóides, para os machos maduros sexualmente e ducto não-enovelado para os machos imaturos sexualmente (*cf.* ALDRIDGE, 1979; ALMEIDA-SANTOS, 2005; SHINE, 1977). O volume dos testículos foi estimado considerando a fórmula para o volume de elipsóide ($\frac{3}{4} \cdot \pi \cdot a \cdot b \cdot c$, onde: a = metade do comprimento, b = metade da largura e c = metade da espessura). Os dados referentes ao volume do testículo de cada indivíduo foram divididos pelo CRC dos mesmos, para eliminar o efeito do tamanho do corpo e foram tomados com o auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,1mm. Os testículos também foram pesados com o auxílio de uma balança digital de precisão de 0,1g.

Fêmeas: diâmetro do maior folículo ovariano (dados tomados com paquímetro digital com precisão de 0,1mm) ou presença de embriões no oviduto, assim como o aspecto do oviduto e presença de torção da musculatura uterina, que indica ocorrência de cópula na estação reprodutiva passada. As fêmeas foram consideradas sexualmente maduras (adultas) quando apresentaram folículos vitelogênicos ou embriões no oviduto (*cf.* ALDRIDGE, 1979; ALMEIDA-SANTOS, 2005; SHINE, 1977).

Para ambos os sexos foram tomadas as medidas do fígado e dos rins (massa, comprimento, largura e espessura), e a massa de gordura abdominal com auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,1mm e uma balança digital de precisão de 0,1g respectivamente. Além disso, observações acerca da estrutura macroscópica do fígado, dos rins e da gordura abdominal foram anotadas.

O índice hepatossomático (IHS) – expresso como a porcentagem da massa corpórea representada pelo fígado [$IHS=(\text{massa do fígado}/\text{massa corpórea total})\times 100$], o índice gordura somática – (IGS) – expresso como a porcentagem da massa corpórea representada pela gordura abdominal [$IHS=(\text{massa da gordura abdominal}/\text{massa corpórea total})\times 100$] e o índice renalssomático IRS - expresso como a porcentagem da massa corpórea representada pelo rim [$IRS=(\text{massa do rim}/\text{massa corpórea total})\times 100$], foram registradas para ambos os sexos.

Foram retiradas amostras do fígado (duas cotas de aproximadamente 1cm^3) para os procedimentos histológicos, extração dos lipídeos e proteínas totais ao longo das estações do ano para os machos e dos estágios reprodutivos para as fêmeas. Para os rins o mesmo procedimento foi adotado, porém, para ambos os sexos a análise foi realizada ao longo das estações.

1.2.3 Análises histológicas

Para as análises microscópicas, foi coletado aproximadamente 1cm^3 do fígado e dos rins em ambos os sexos. As amostras foram processadas de acordo com a técnica rotineira de histologia (BEHMER et al., 1976) que consiste na fixação das amostras em solução de álcool a 70% por 24 horas e em seguida foram transferidas para formol a 10%.

O material foi desidratado em uma série crescente de etanol, de 70 a 100% e diafanizados em xilol, seguida da inclusão em parafina. Seguiu-se então, com a trimagem dos blocos e a obtenção de cortes (micrótomo Leica RM 2035) de 6-7 μm de espessura. Os cortes

foram corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (H/E) (JUNQUEIRA et al., 1979) para o estudo geral dos tecidos.

Esse processo foi realizado no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular Veterinária – VETPAT em Campinas, SP.

1.2.4 Extração dos lipídeos totais do fígado e dos rins

Aproximadamente 1cm³ do tecido hepático e do tecido renal foram retirados e os lipídeos totais foram extraídos de acordo com o método de Folch et al. (1957).

As amostras foram pesadas e diluídas em uma solução contendo clorofórmio, metanol e água em uma proporção de 2:1:0.5 e, posteriormente homogeneizadas. O conteúdo homogeneizado foi centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. A fase líquida inferior foi retirada – fase esta que corresponde à concentração de lipídeos – através da técnica de dupla pipeta. Esse procedimento foi repetido três vezes, adicionando-se clorofórmio para a remoção dos lipídeos remanescentes. Em seguida, foi realizada a evaporação do solvente em nitrogênio e o extrato lipídico foi armazenado em freezer -20 °C para as posteriores análises.

1.2.5 Quantificação dos lipídeos totais do fígado e dos rins

A concentração dos lipídeos totais do tecido hepático e renal foi analisada pelo método colorimétrico de Frings et al. 1972, utilizando-se como padrão o óleo de fígado de bacalhau (*Cod liver oil fatty acid methyl esters*, SIGMA[®] - Saint Louis, EUA). A solução padrão e as amostras foram ressuspensas em clorofórmio e uma alíquota foi pipetada em tubos de ensaio. Os tubos foram mantidos em uma estufa a 70 °C por 15 minutos para evaporação do solvente. Ao extrato lipídico seco foi adicionado ácido sulfúrico concentrado e colocado em banho-maria a 100 °C por 10 minutos. Posteriormente ao resfriamento dos tubos de ensaio, adicionou-se sulfofosfovanilina e as soluções foram levadas para banho-maria a 37 °C por 15 minutos.

As amostras foram lidas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm. A concentração de lipídeos totais foi calculada utilizando-se a curva de óleo do fígado de bacalhau, que havia sido preparada com antecedência e os resultados foram expressos em mg/g para as amostras teciduais.

Esse procedimento foi realizado em colaboração com Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA) do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

1.2.6 Extração de proteínas totais do fígado

As amostras dos tecidos foram extraídas após precipitação e solubilização segundo Milligan; Girard, (1993). As amostras foram pesadas e homogeneizadas em 5 volumes da solução de ácido perclórico (PCA). Em seguida foram centrifugadas a 11.100 rpm em centrífuga eppendorf por 5 minutos.

O precipitado foi ressuspenso em 4 volumes de PCA e o procedimento de centrifugação foi repetido mais 3 vezes. Logo após a última centrifugação, foram adicionados 14 volumes de hidróxido de potássio (KOH) e o precipitado foi mantido por 24 horas em agitação constante em temperatura ambiente.

1.2.7 Quantificação das proteínas totais do fígado

A concentração de proteínas totais dos tecidos foi analisada pelo método colorimétrico de Lowry et al. (1951). O solubilizado restante foi diluído 100 vezes com água destilada para dosagem protéica. O volume diluído foi pipetado em tubos eppendorfs e adicionado 1000 µL da mistura reativa (hidróxido de sódio + carbonato de cálcio + tartarato de sódio e potássio + sulfato de cobre).

Posteriormente, adicionou-se 100 µL de reagente Folin-Ciocalteu (1:1) e após 30 minutos as amostras foram lidas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 660 nm.

A concentração de proteínas totais foi calculada utilizando-se a curva de albumina sérica bovina (*Bovine serum albumin*, SIGMA®) e os resultados foram expressos em mg/g.

Esse procedimento foi realizado em colaboração com Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA) do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

1.2.8 Análises estatísticas

A variação sazonal das médias do total de lipídeos e proteínas hepáticas e renais foi comparada ao longo do ciclo anual dos machos e ao longo dos diferentes estágios reprodutivos das fêmeas: vitelogênese primária (folículos ovarianos menores que 10mm), vitelogênese secundária (folículos ovarianos maiores que 10mm) e prenhes (presença de embriões no oviduto). Testes de normalidade e homogeneidade de variância foram aplicados e quando cumpriam os requerimentos de uma análise paramétrica, os resultados foram comparados utilizando-se o teste de Análise de Variância (one-way ANOVA) seguido do teste Tukey ($p < 0.05$). As análises foram realizadas a partir do programa BioStat 5.0.

1.3 Resultados

Para as análises relacionadas aos índices hepatossomático, lipossomático, lipídeos e proteínas totais do fígado foram levados em consideração a bialidade do ciclo reprodutivo das fêmeas e o ciclo anual dos machos (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2005). Portanto, para as fêmeas, foram considerados os diferentes estágios reprodutivos – vitelogênese primária, secundária e prenhez. Para os machos, devido ao ciclo reprodutivo ser anual, as variáveis foram consideradas ao longo das estações do ano. Para a avaliação dos parâmetros referentes ao rim, foi considerada a variação sazonal para ambos os sexos, já que a participação do rim nos processos reprodutivos, em condições naturais, está restrito aos machos (KRHOMER, 2004).

Para a descrição microscópica do fígado de *C. durissus*, foi necessário consultar fontes bibliográficas referentes à anatomia e fisiologia humanas, pois além de existir um forte padrão conservativo entre as estruturas hepáticas de todos os vertebrados (SHAFFNER, 1998), a literatura herpetológica não disponibiliza descrições hepáticas para muitas espécies de répteis.

1.3.1 Proporção machos e fêmeas reprodutivos e não reprodutivos

Do total de fêmeas (N=40), 7 estavam prenhes (17.5%), 16 estavam em vitelogênese primária (40%) e 17 em vitelogênese secundária (42.5%) (Tabela 1).

Todos os machos de *C. durissus* avaliados nesse estudo (n= 43) se encontravam maduros sexualmente, com ductos deferentes enovelados, e com coloração esbranquiçada, indicando presença de espermatozoides ao longo de todo o ducto deferente. Além disso, foi

confirmada a maturidade sexual com análises histológicas dos testículos e do segmento sexual renal – SSR.

A análise anual dos status reprodutivos de machos e fêmeas está descrito na Tabela 1. Para tal análise, fêmeas reprodutivas foram consideradas aquelas que estavam em vitelogênese secundária (folículos >10mm), prenhes (embriões no oviduto) ou pós-parto (oviduto preguiado), juntas . As fêmeas não reprodutivas são representadas pelas fêmeas que estavam em vitelogênese primária (folículos < 10mm).

Tabela 1- Variação anual da proporção de indivíduos nos diferentes status reprodutivos de *Crotalus durissus*-SP

Ano	2009	2010
	N (proporção)	N (proporção)
Fêmeas Reprodutivas	10 (47,62%)	11 (57,89%)
Fêmeas Não Reprodutivas	11 (52,38%)	8 (42,11%)
Machos Reprodutivos	24 (100%)	19 (100%)
Machos Não Reprodutivos	0	0

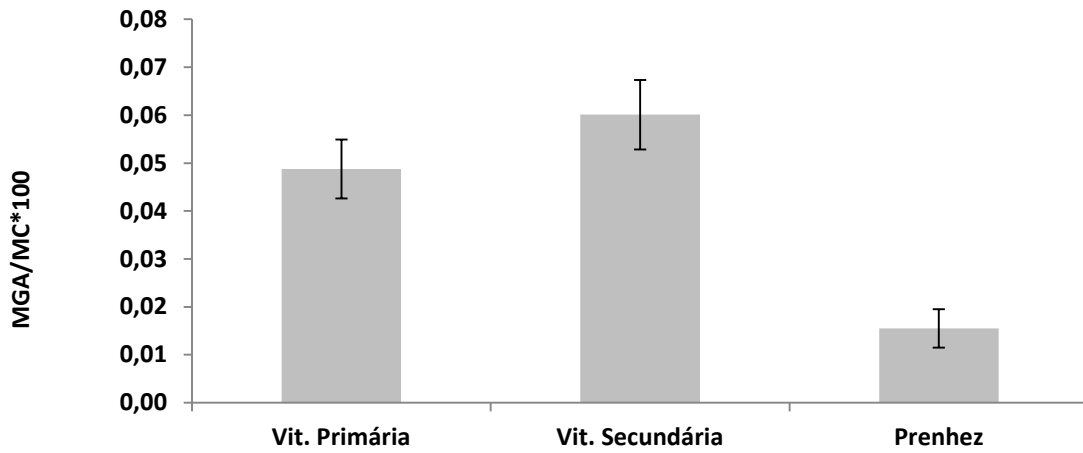
1.3.2 Parâmetros ponderais e morfométricos - fêmeas

A média de CRC das fêmeas foi de 884.8 ± 63.9 mm e de CC 67 ± 7.4 mm. A média da massa corpórea foi 744.3 ± 259.6 g.

Observou-se um padrão idêntico para as médias dos índices hepatossomático e lipossomático.

O índice lipossomático (ILS, detectado pela quantidade relativa da gordura abdominal) variou significativamente ($p=0.001$; $F=9.19$) entre a vitelogênese primária e a prenhez ($p<0.05$) e entre a vitelogênese secundária e a prenhez ($p<0.01$). A média do índice lipossomático foi de 0.04 ± 0.02 para a vitelogênese primária, 0.06 ± 0.02 para a vitelogênese secundária e para a prenhez a média foi de 0.01 ± 0.009 (Figura 1).

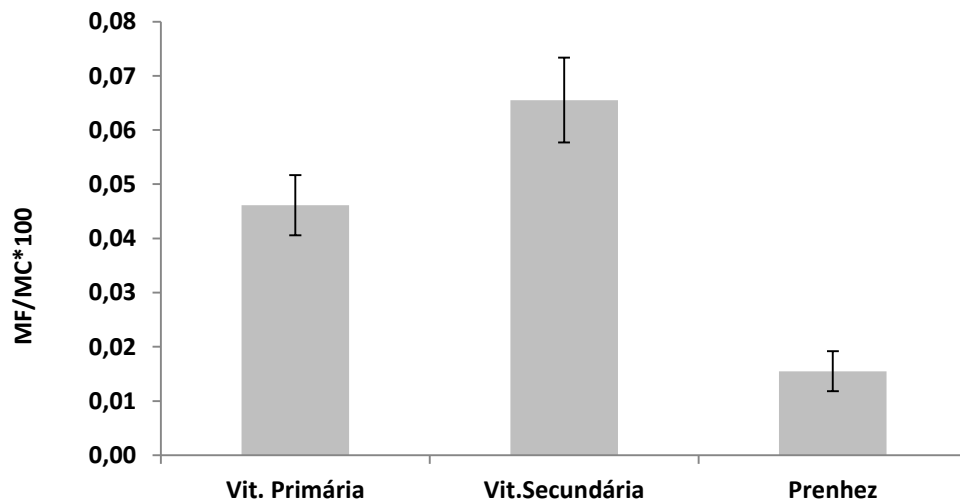
Figura 1 - Índice lipossomático das fêmeas de *C. durissus*.



Legenda - Massa da gordura abdominal (g) dividida pela massa corpórea (g). Os valores referentes à prenhez variaram significativamente entre vitelogênese primária e secundária. As linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão das médias dos valores.

A média do índice hepatossomático (IHS, massa relativa do fígado) durante a vitelogênese primária foi de 0.04 ± 0.02 ; durante a vitelogênese secundária a média foi de 0.06 ± 0.02 e para a prenhez a média foi de 0.01 ± 0.009 . Foi encontrada diferença significativa ($p=0.003$; $F=11.92$) entre a vitelogênese primária e a prenhez ($p<0.05$) e a vitelogênese secundária e a prenhez ($p<0.01$). (Figura 2).

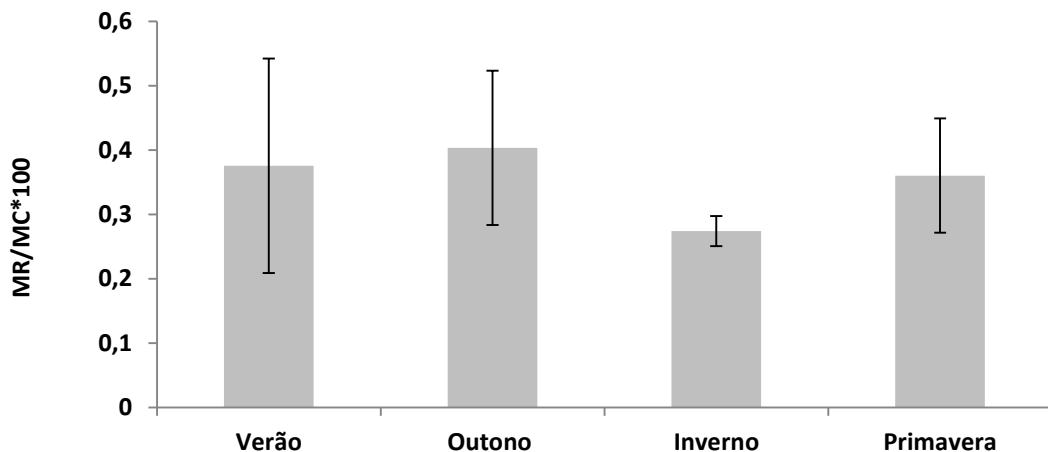
Figura 2 - Índice Hepatosomático das fêmeas de *C. durissus*.



Legenda- Massa do fígado (g) dividida pela massa corpórea (g). Os valores referentes à prenhez variaram significativamente entre a vitelogênese primária e a prenhez e a secundária e a prenhez. As linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão das médias dos valores.

A média da massa relativa dos rins (índice “renalssomático”) não variou sazonalmente ($F=1,72$; $p=0,18$), atingindo menores valores durante o inverno, com média de 2,7% do total da massa corpórea. Nas demais estações, os valores foram muito similares (Figura 3).

Figura 3 - Índice Renalssomático das fêmeas de *C. durissus*.

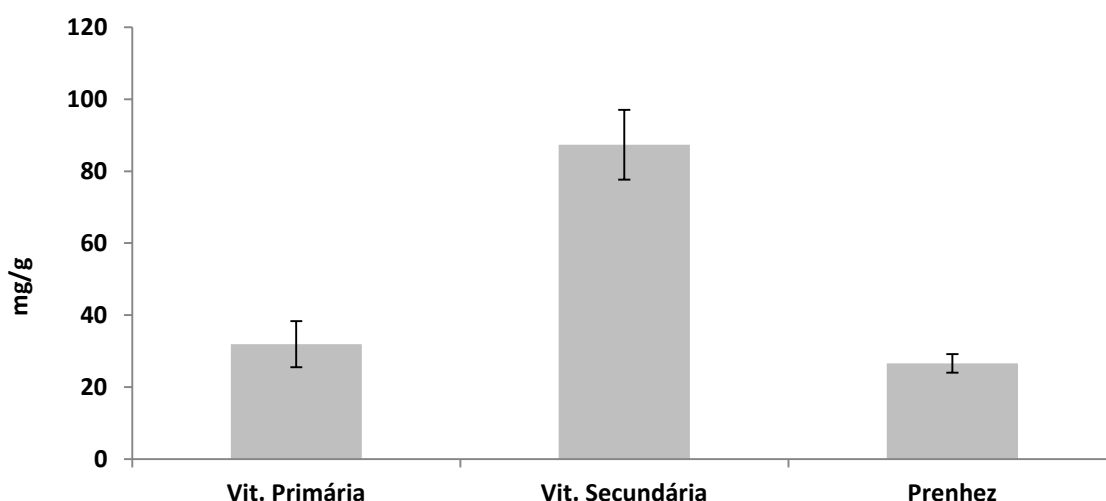


Legenda - Massa do rim (g) dividida pela massa corpórea (g). A variação das médias não revelou significância entre as estações. As linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão das médias dos valores

1.3.3 Substratos energéticos – fêmeas

A variação de lipídeos totais por grama de tecido hepático variou significativamente ($p=0.0001$; $F=22.39$) entre os estágios reprodutivos – vitelogênese primária e vitelogênese secundária ($p<0.01$) e entre a vitelogênese secundária e a prenhez ($p<0.01$). A média da quantidade de lipídeos para a vitelogênese primária foi de $31.9\pm 6.4g$, para a vitelogênese secundária a média foi de $87.34\pm 9.7g$ e ao longo da prenhez $26.5\pm 2.6g$. Este padrão é muito similar ao padrão das variações das médias encontrado para os índices hepatossomático e lipossomático (Figura 4).

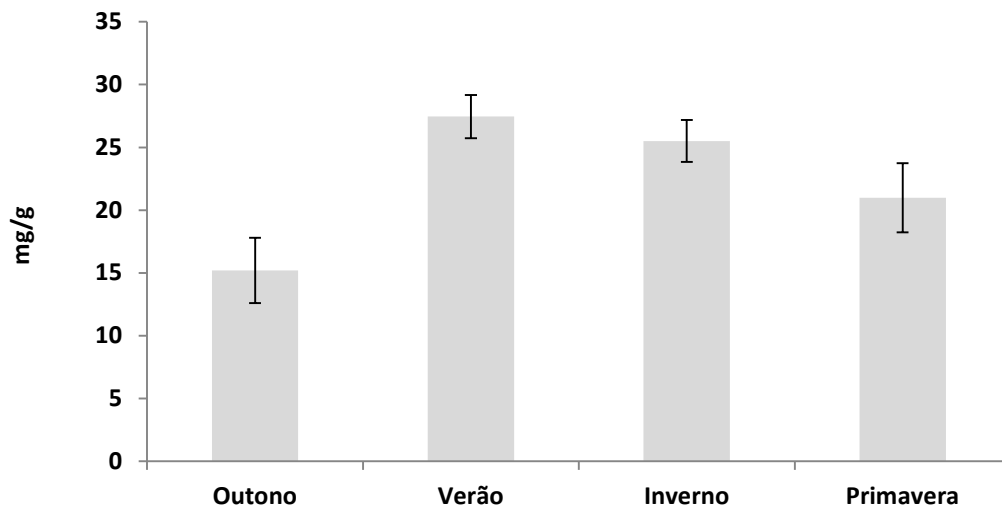
Figura 4 - Lipídeos totais do fígado das fêmeas de *C. durissus*.



Legenda – Miligrama de lipídeos por grama de tecido. A significância foi encontrada na variação dos valores médios da vitelogênese primária e secundária e a prenhez e a vitelogênese secundária. As linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão das médias dos valores

A quantidade média de lipídeos por grama de tecido renal não variou significativamente entre as estações ($F=3.03$; $p=0.59$). A estação que apresentou menor média de lipídeos por grama de tecido do rim foi o outono, com $15.21g$. O verão apresentou a maior média entre as estações com $27.45g$ de lipídeos por grama de tecido renal (Figura 5).

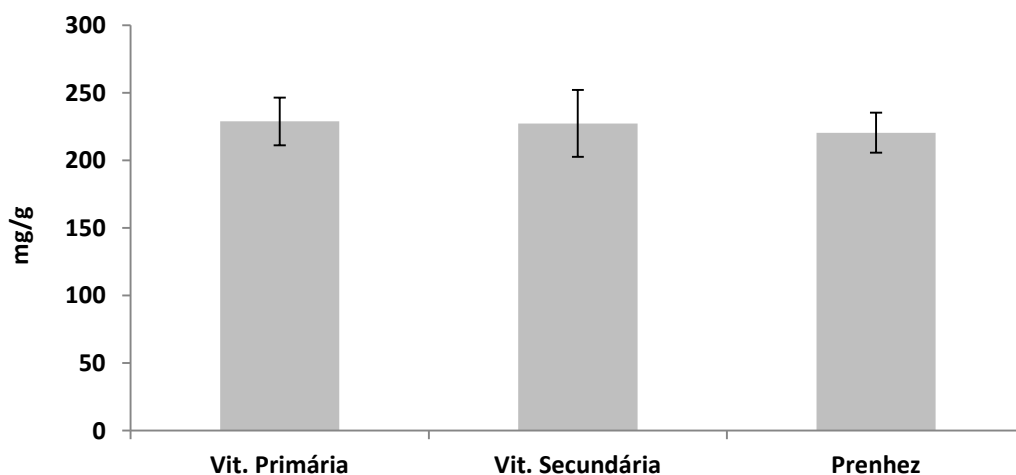
Figura 5 – Lipídeos totais do rim das fêmeas de *C. durissus*



Legenda – Miligrama de lipídeos por grama de tecido. Não foi encontrada variação significativa das médias entre as estações. As linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão das médias dos valores

O conteúdo proteico do fígado (Figura 6) não variou significativamente entre os estágios reprodutivos ($p=0.26$; $F=1.43$), mantendo-se praticamente inalterado, com média de 228.8 ± 17.6 g durante a vitelogênese primária, 227.3 ± 24.7 g durante a vitelogênese secundária e durante a prenhez a média foi de 220.4 ± 14.8 g.

Figura 6 – Proteínas totais do fígado de fêmeas de *C. durissus*.



Legenda – Miligramas de proteínas por grama de tecido. Não foi encontrada variação significativa entre as estações. As linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão das médias dos valores.

1.3.4 Ciclo reprodutivo – fêmeas

A vitelogênese secundária foi observada a partir de março (fim do verão) até setembro (primavera), mês no qual também se observou presença de embriões no oviduto. Os embriões totalmente formados foram registrados a partir de janeiro (verão). Fêmeas em vitelogênese primária foram encontradas ao longo do ano todo (Figuras 7 e 8).

Figura 7 – Ciclo reprodutivo das fêmeas de *C. durissus* em relação à distribuição do maior folículo ovariano e presença de embriões no oviduto.

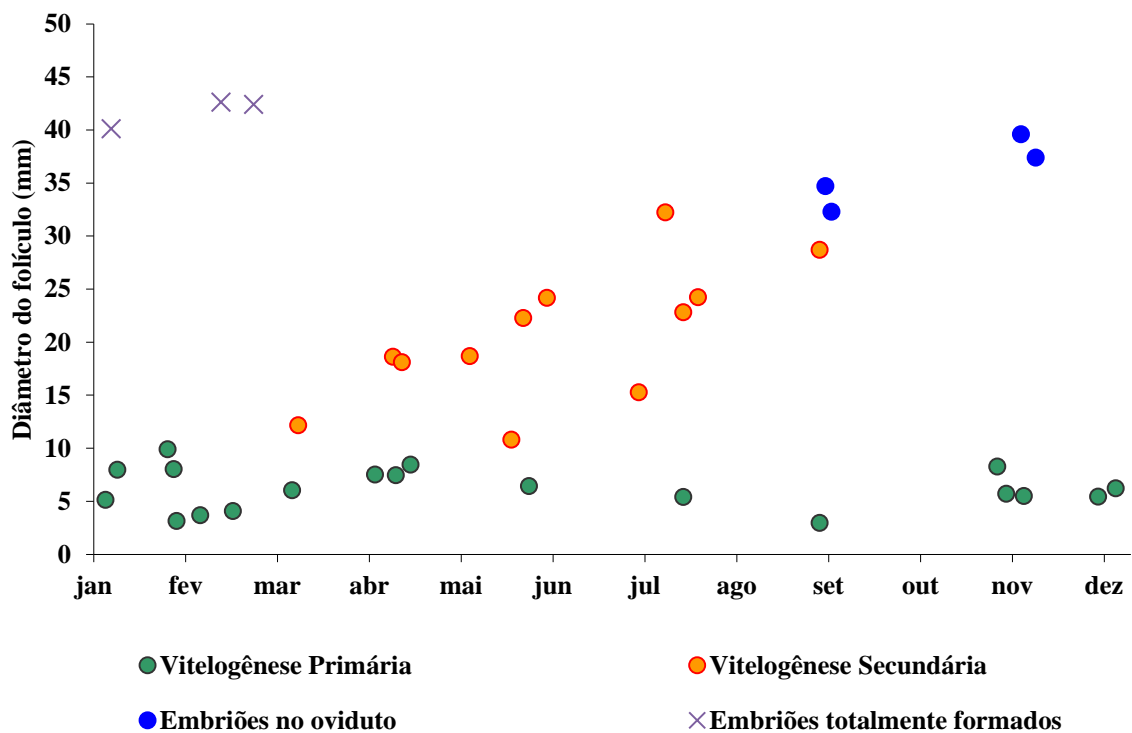
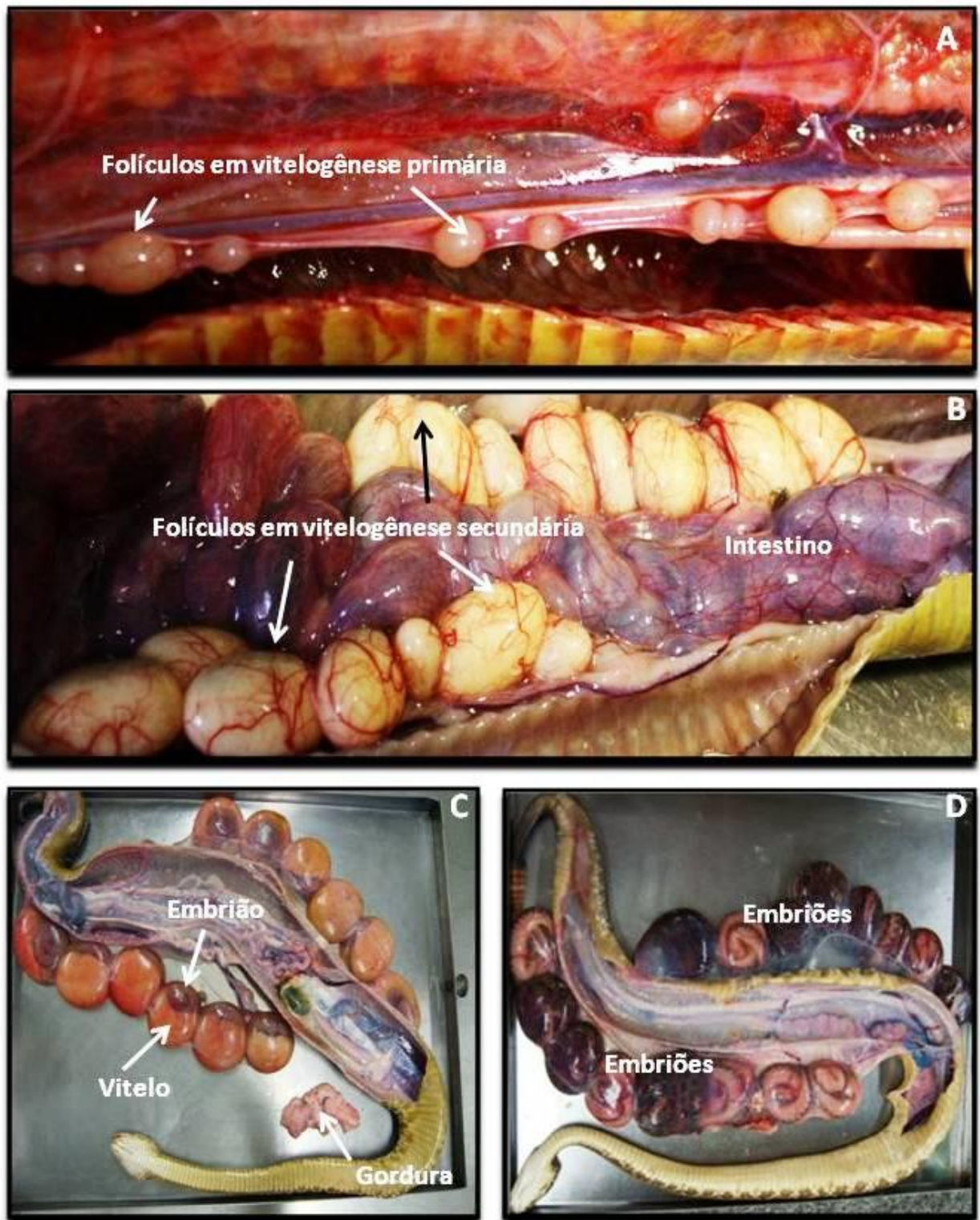


Figura 8 – Estágios reprodutivos das fêmeas de *Crotalus durissus*.



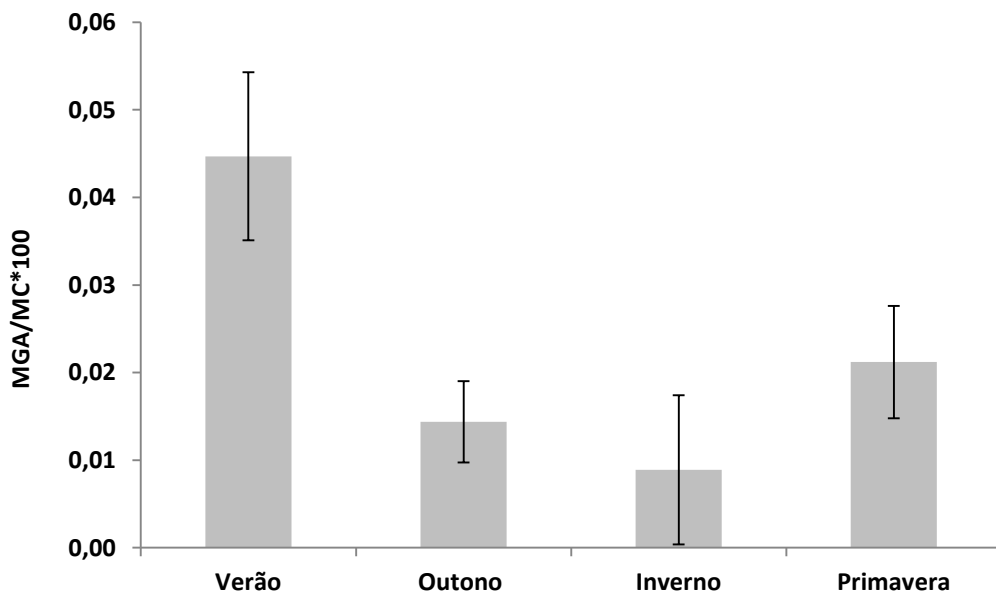
Legenda - A) Vitelogênese primária (folículos ovarianos <10mm); B) vitelogênese secundária (folículos ovarianos >10mm); C) Prenhez em estágio intermediário de desenvolvimento embrionário; D) Prenhez em estágio avançado de desenvolvimento embrionário.

1.3.5 Parâmetros ponderais e morfométricos - machos

A média do CRC foi de $913.1 \pm 121.9\text{mm}$ e do CC foi de $104.7 \pm 16.2\text{mm}$. A massa corpórea variou de 265 à 1.996g, com uma média de $748.2 \pm 367.0\text{g}$.

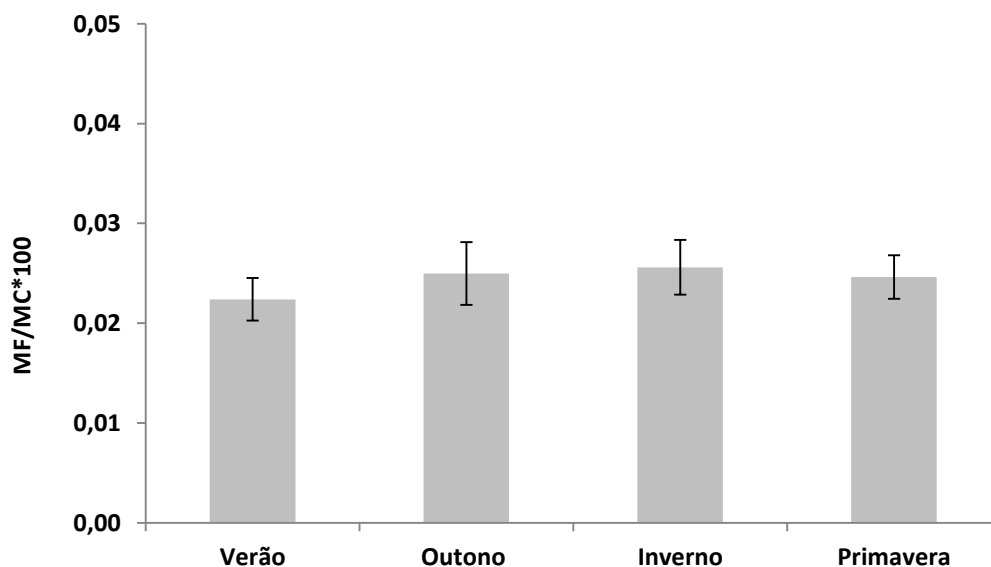
A variação do índice lipossomático (Figura 9) mostrou-se significativamente diferente ($F=2.95$; $p=0.04$) entre o verão e o outono ($p=0.05$). A variação do índice hepatossomático não revelou variação significativa ($p=0.55$ e $F=0.72$) (Figura 10).

Figura 9 - Índice lipossomático dos machos de *C. durissus*.



Legenda - Massa da gordura abdominal (g) dividida pela massa corpórea (g). A significância foi encontrada entre os valores referente ao verão e o outono. As linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão das médias dos valores

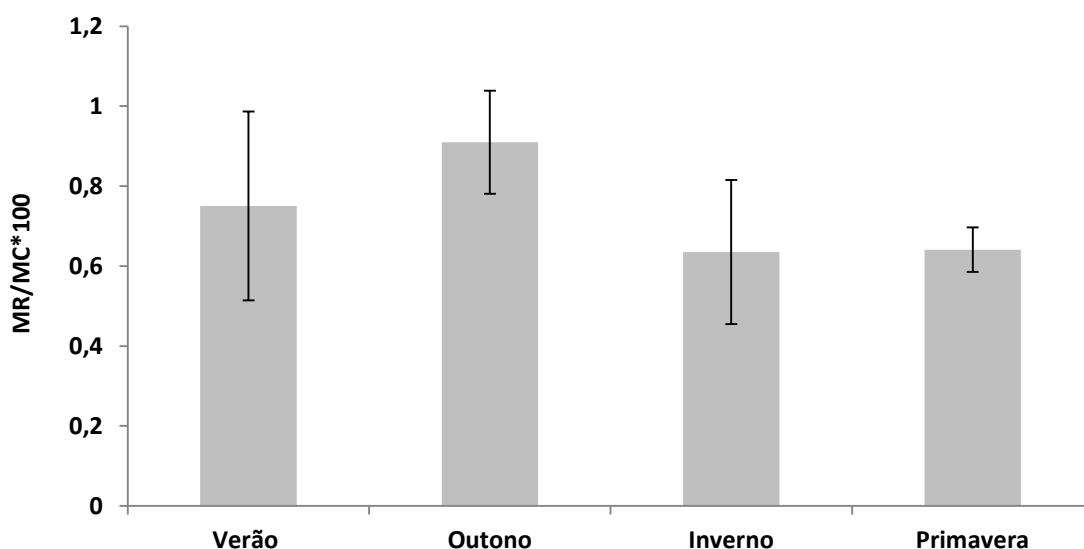
Figura 10 - Índice Hepatossomático dos machos de *C. durissus*



Legenda - emassa do fígado (g) dividida pela massa corpórea (g). A variação das médias entre as estações não revelou significância. As linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão das médias dos valores

A média da massa relativa dos rins dos machos (Figura 11) variou significativamente entre as estações ($F=4.3$; $p=0.01$). O outono revelou maior média em relação à primavera ($p=0.05$) e em relação ao inverno ($p=0.05$), correspondendo a 0.9% da massa corpórea.

Figura 11 - Índice Renalssomático dos machos de *C. durissus*

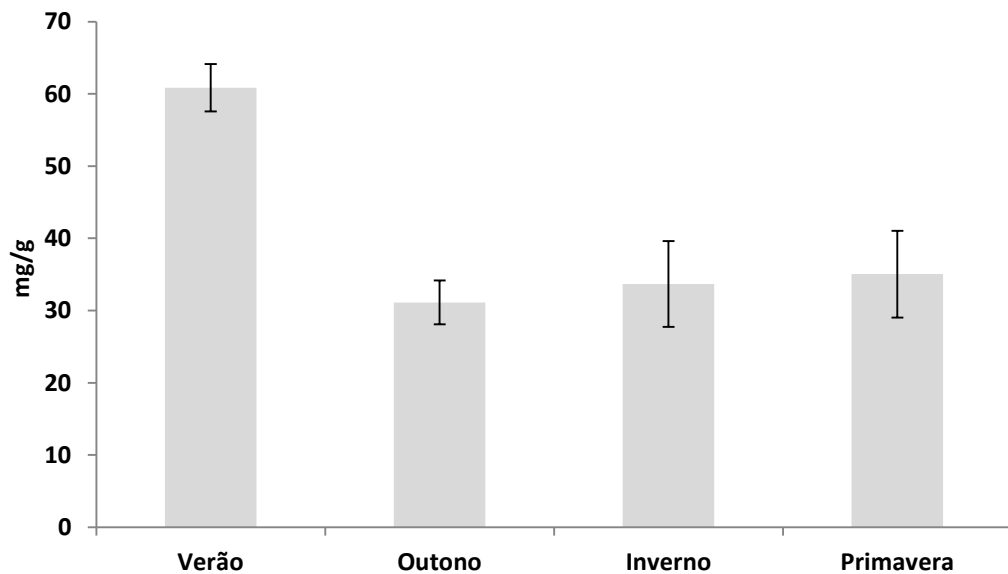


Legenda - Massa do rim (g) dividida pela massa corpórea (g). A média dos valores referentes ao outono variou significativamente em relação à primavera e ao inverno. As linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão das médias dos valores

1.3.6 Substratos energéticos

O padrão de variação das médias dos valores dos lipídeos totais do fígado (Figura. 12), revelou maiores níveis durante o verão. Foi encontrada diferença significativa ($p=0.001$; $F=8.55$) entre o verão e as outras estações ($p<0.01$).

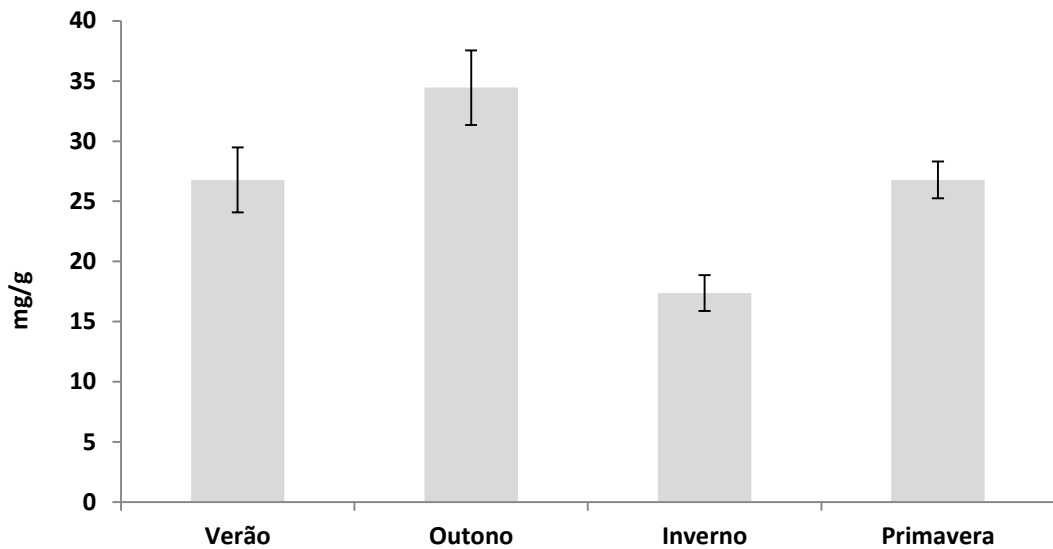
Figura 12 - Lipídeos totais do fígado dos machos de *C. durissus*.



Legenda - Miligrama de lipídeos por grama de tecido. A significância foi encontrada variação das médias entre o verão e as demais estações do ano. As linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão das médias dos valores

Para a quantidade de lipídeos dos rins, foi encontrada variação significativa ($F=14.57$; $p=0.0002$) entre o inverno e as demais estações do ano, atingindo maiores valores durante o outono (Figura 13).

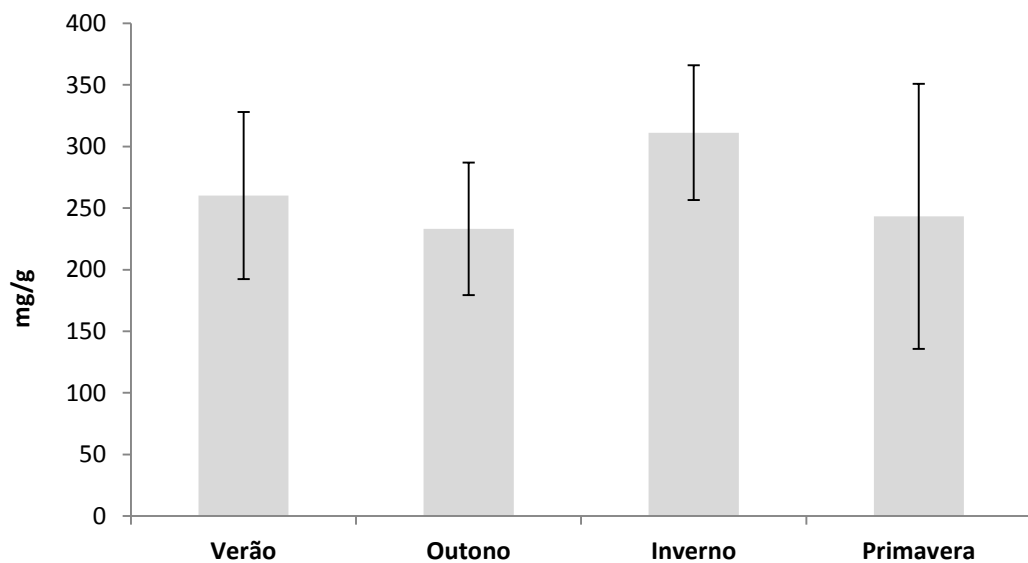
Figura 13 - Lipídeos totais dos rins dos machos de *C. durissus*.



Legenda - Miligrama de lipídeos por grama de tecido. Os valores referentes ao inverno diferiram significativamente das demais estações. As linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão das médias dos valores

Os valores referentes à média das proteínas totais do fígado (Figura 14), quase não variaram entre as estações ($p=0.35$; $F=1.15$), apresentando médias muito similares, atingindo maiores valores durante o inverno.

Figura 14 - Proteínas totais do fígado dos machos de *C. durissus*.

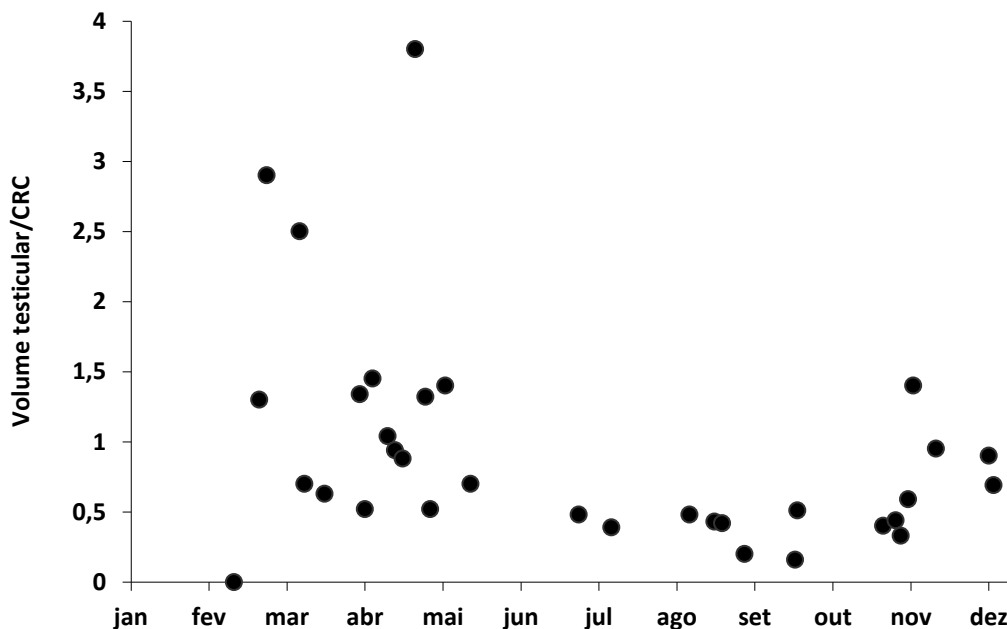


Legenda - Miligrama de lipídeos por grama de tecido. A variação entre as médias não revelou diferença significativa. As linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão das médias dos valores.

1.3.7 Ciclo testicular – volume

O volume dos testículos de *C. durissus* amostradas (Figura 15) revelou um discreto aumento a partir da primavera, alcançando os maiores valores ao longo do verão. Os menores volumes testiculares foram observados durante o inverno. A variação significativa das médias dos volumes foi detectada ($F=4.02$; $p=0.01$) entre o verão e o inverno ($p=0.05$) e entre o outono e o inverno ($p=0.05$).

Figura 15 – Ciclo testicular dos machos em relação ao volume do testículo dividido pelo comprimento rostro-cloacal (CRC) ao longo do ano.

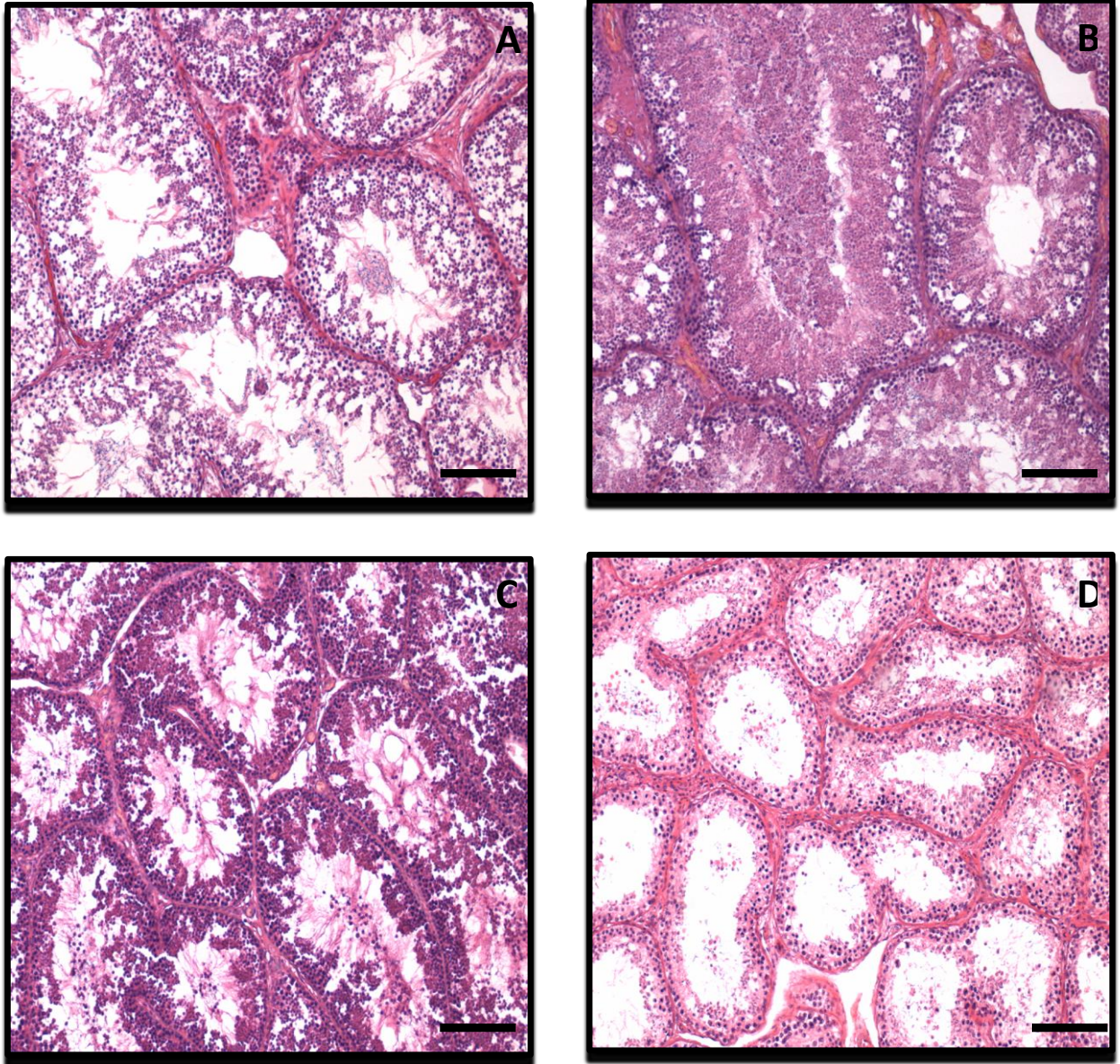


1.3.8 Ciclo testicular – histologia

De um modo geral, as análises histológicas revelam um padrão sazonal para o ciclo testicular das *C. durissus* do Estado de São Paulo. Durante a primavera observam-se alguns espermatozoides completamente formados concentrados no lúmen dos túbulos seminíferos e um epitélio germinativo com inúmeras espermatogônias e espermatócitos evidenciando o início da atividade testicular nessa estação. No verão, o lúmen está completamente preenchido por espermatozoides prontos e espermátides em processo de espermição, demonstrando o pico de atividade testicular. Ao longo do outono, observa-se a uma diminuição no processo de formação dos espermatozoides, indicativos do início do processo

de regressão testicular com apenas poucas espermatogônias ainda dispersas pelo lúmen. A regressão total dos testículos é observada durante o inverno, quando apenas espermatogônias são encontradas no epitélio e o lúmen atinge seu maior diâmetro (Figura 16).

Figura 16– Histologia do testículo de *C. durissus*



Legenda - A = primavera, início do crescimento do epitélio germinativo nos túbulos seminíferos, observa-se presença de espermatócitos e espermatogônias; B=verão, pico da atividade testicular – observa-se lúmen preenchido por espermatídes e espermatozoides totalmente formados; C=outono, início do processo de regressão, com diminuição do epitélio germinativo dos túbulos seminíferos; D=inverno, regressão total do epitélio do epitélio germinativo dos túbulos seminíferos e aumento acentuado do lúmen. Todas as fotomicrografias estão em aumento de 10X.

1.3.9 Alterações Hepáticas

As alterações hepáticas foram avaliadas principalmente sob o ponto de vista do metabolismo de lipídeos no tecido as quais são facilmente visualizadas no parênquima hepático. Essa alteração é descrita como vacuolização micro e macrogoticular difusa nos hepatócitos ou mais genericamente, como esteatose macro e microgoticular, e ocorre normalmente em pequenas quantidades, entretanto, há variações dessa vacuolização durante o processo vitelogênico em fêmeas.

A esteatose microgoticular foi inferida por observações da quantidade de gotículas de lipídeos permeando o citoplasma dos hepatócitos, sem a alteração da conformação original deles. Já a esteatose macrogoticular foi detectada quando gotículas de lipídeos se coalescem no citoplasma dos hepatócitos, formando uma gota maior, empurrando o núcleo do hepatócito para apenas um lado, forçando-o mudar sua configuração original.

Histologicamente, a vacuolização é visualizada em várias circunferências brancas de diversos diâmetros, com o aspecto de vazio no parênquima hepático. Para uma maior compreensão das alterações hepáticas, faz-se necessário uma breve explanação da descrição macro e microscópica do fígado.

Contudo, não é objetivo desse trabalho descrever detalhadamente todas as estruturas celulares do fígado, tampouco o metabolismo hepático em *Crotalus durissus*, sobretudo pelo fato que a microscopia de luz e a coloração histológica básica (hematoxilina e eosina) não permitem tais extrapolações, e sim, permitem apenas evidenciar as possíveis alterações hepáticas que estejam vinculadas aos processos reprodutivos da referida espécie.

1.3.10 Descrição da estrutura macroscópica e microscópica do fígado de *C. durissus*

O fígado em ambos os sexos corresponde à 2-3% da massa corpórea, é constituído por dois lóbulos, sendo o direito, aproximadamente 33% maior em comprimento que o esquerdo. A porção do lóbulo direito que excede do esquerdo é estreitada gradualmente até a porção final, mais caudal (Figura 17A). Quanto à localização, o fígado se estende do coração até a vesícula biliar (Figura 17E) e é revestido por um tecido conectivo fibroso, fino e de tom esbranquiçado que se torna mais espesso à medida que se aproxima da união longitudinal dos dois lóbulos. Ventralmente estão localizados as veias e artérias abdominais que realizam o aporte sanguíneo da cavidade peritoneal para a veia porta. A coloração varia de vermelho-

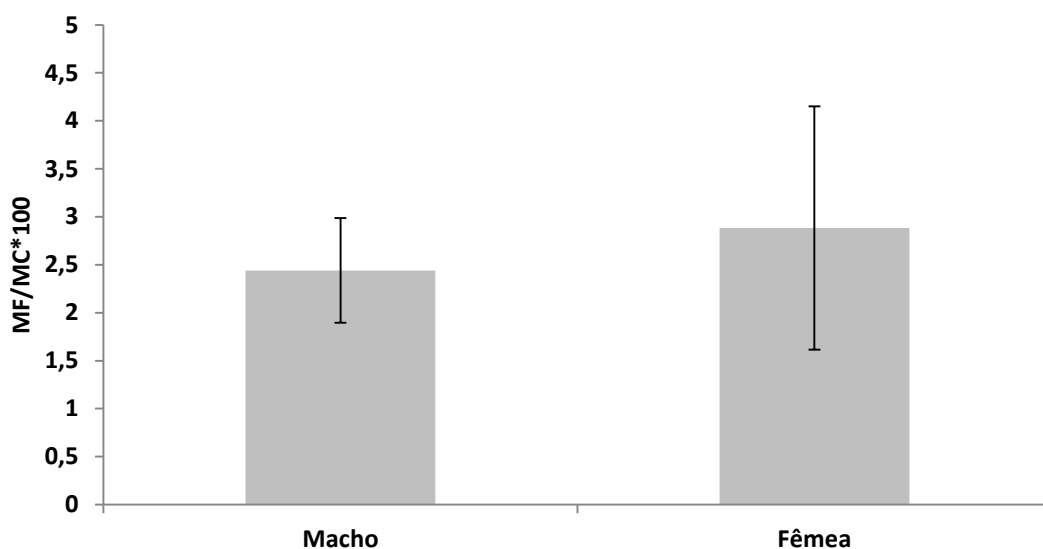
tinto à marrom escuro (Figura. 17C), com aspecto sempre uniforme – ou seja, sem pigmentações. As médias do comprimento, largura e espessura constam na Tabela 2.

Tabela 2-Valores das médias da biometria do fígado de *C. durissus* – SP

Biometria do Fígado (mm)	Machos	Fêmeas
	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão
Largura	22.1 ± 4.4	24.2 ± 5.9
Comprimento	177.3 ± 53.1	172.8 ± 34.08
Espessura	4.9 ± 1.3	5.2 ± 1.8

A variação das médias da massa relativa do fígado de machos e fêmeas (Figura 18) não diferiu significativamente ($F=3.31$; $p=0.07$), entretanto, nas fêmeas, observa-se uma maior massa relativa.

Figura 18 – Variação das médias da massa realtiva do fígado em machos e fêmeas de *C. durissus*.



Legenda - As linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão das médias dos valores.

Microscopicamente o fígado de *Crotalus durissus* possui o parênquima constituído principalmente por hepatócitos. Os hepatócitos têm formato poliédrico e medem 40-60 μm , com núcleos dispostos centralmente e alguns nucléolos também são visíveis. Os hepatócitos se agrupam em placas que se anastomosam entre si formando unidades morfológicas chamadas lóbulos hepáticos. Nestes, os hepatócitos se dispõem em placas orientadas radialmente, entretanto essa configuração nem sempre é nítida em *Crotalus durissus*.

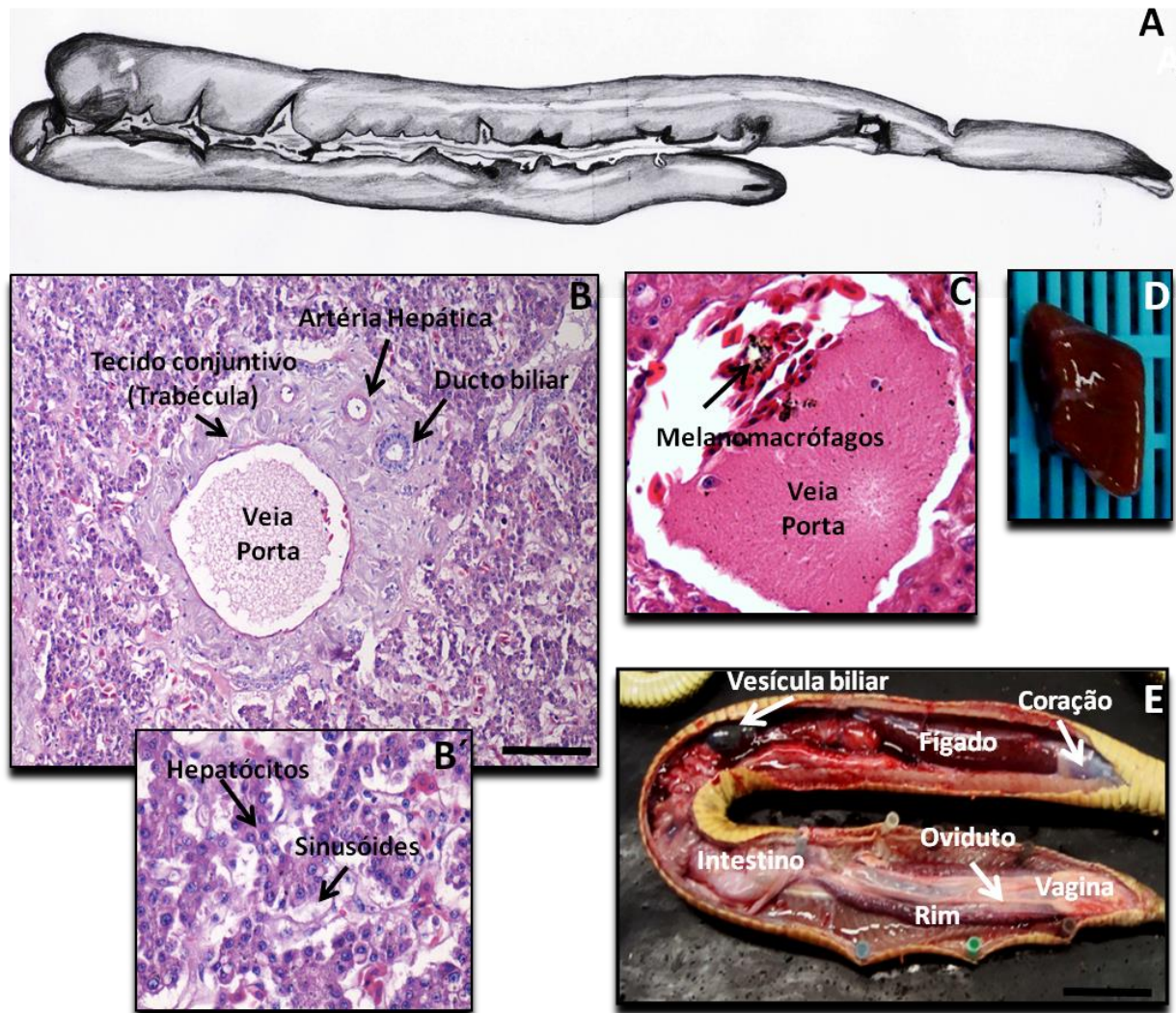
Cada placa é constituída por células dispostas em uma só camada. Cada lóbulo é uma massa poliédrica de tecido hepático que se encostam uns nos outros em quase toda sua extensão. No entanto, em algumas regiões, os lóbulos ficam separados por tecido conjuntivo e vasos, que constituem a trabécula hepática, que pode variar de conformidade – apresentando-se mais ou menos densos (Figura 17B). Estas regiões recebem o nome de espaços-porta (GELLER; PETROVIC, 2009). Cada espaço porta é constituído por um ramo do ducto biliar, um ramo da veia porta e um ramo da artéria hepática (Figura 17B). Entre os hepatócitos existem diminutos vasos chamados capilares sinusóides (Figura 17B).

Os sinusóides são capilares que ocupam o espaço entre as placas de hepatócitos. Suas paredes são revestidas de células endoteliais típicas e macrófagos que, no fígado, recebem o nome de células de “Kupffer”, que possuem função fagocitária. O estreito espaço que separa o sinusóide dos hepatócitos recebe o nome de “Espaço de Disse” o qual é composto por fibras reticulares (GELLER; PETROVIC, 2009).

Um terceiro tipo de célula na parede do sinusóide é a chamada célula de “Ito” que, supostamente, teria um papel na fibrogênese. Os capilares sinusóides desembocam em uma veia localizada no centro do lóbulo chamada veia centrolobular a qual é o ramo inicial da veia hepática (SHAFFNER, 1998). Devido à sua reduzida dimensão do “Espaço de Disse” e de suas respectivas estruturas, a visualização é melhor evidenciada com microscopia eletrônica.

Observou-se ainda, a presença de raros melanomacrófagos periportais apenas em um macho e uma fêmea de *Crotalus durissus* da amostra. Os melanomacrófagos foram observados na região periportal (Figura 17C) como pontos enegrecidos – devido à síntese de melanina que é realizada continuamente por tais células (SANTOS et al., 2009).

Figura 17 – Caracterização morfológica do fígado de *C. durissus*.



Legenda - A) Representação da configuração padrão do fígado de *C. durissus*. Arte de Ana Bárbara Barros; B) Espaço porta e suas respectivas estruturas indicadas pelas setas (aumento 20X); B') Aumento de 40X evidenciando os microvasos sinusóides e os hepatócitos; C) Melanomacrófagos no espaço porta indicados pela seta; D) Coloração padrão de um fragmento do fígado retirado para histologia; E) Localização anatômica do fígado em uma fêmea de *C. durissus*.

1.3.11 Alterações microscópicas do tecido hepático em fêmeas de *C. durissus*

Fêmeas em vitelogênese primária

A avaliação histológica do fígado (Figura 19A) organização radial das placas hepatocitárias pouco ou não evidentes, com hepatócitos preservados com núcleos redondos e pequenos nucléolos por vezes visualizados. O espaço porta se encontra íntegro composto por ductos biliares e ramos da veia porta e artéria hepática em conformidade estrutural.

Fêmeas em vitelogênese secundária

A avaliação microscópica revelou uma organização das placas hepatocitárias pouco evidente. O espaço porta se encontra íntegro, composto por ductos biliares e ramos da veia e artéria hepática normais. Os hepatócitos revelam moderada à intensa vacuolização citoplasmática magroticular, com núcleos redondos e pequenos nucléolos evidentes (Figuras 519B e 19B’).

Fêmeas prenhes

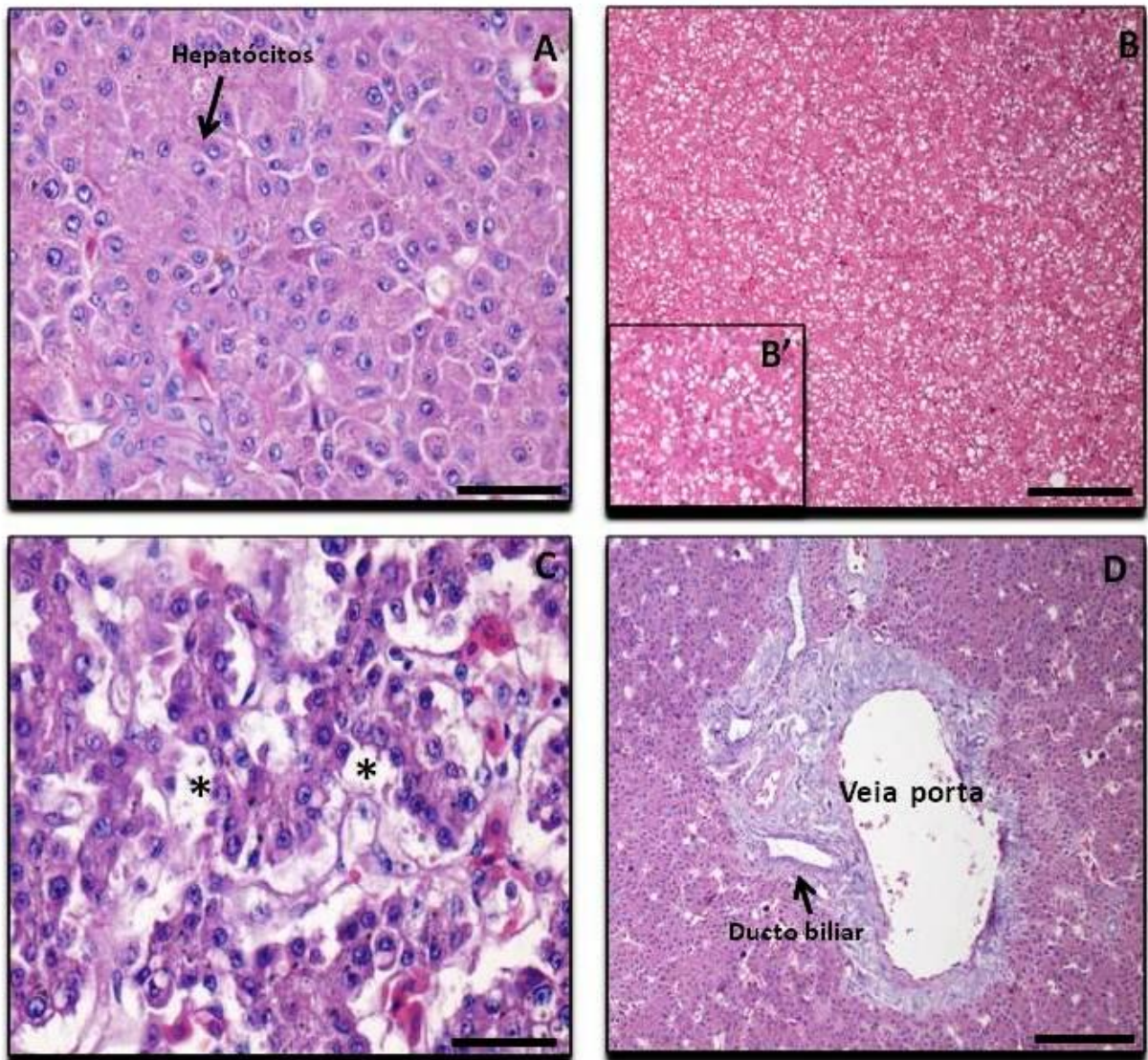
A avaliação histológica (Figura 19C) revelou um moderado à intenso desarranjo trabecular refletido pela organização radial das placas hepatocitárias pouco evidentes. Raros hepatócitos com vacuolização macrogoticular foram encontrados, porém com hepatócitos adjacentes preservados, com núcleo redondo e pequenos nucléolos evidentes.

Observou-se também uma discreta à moderada ectasia sinusoidal difusa - que corresponde à dilatação dos diminutos vasos sanguíneos que se unem para formar a veia central.

Fêmea pós-parto

A avaliação histológica (Figura 19D) revelou organização das placas hepatocitárias não evidente com um intenso desarranjo trabecular. O espaço porta encontra-se com discretos focos de hiperplasia dos ductos biliares. Os hepatócitos mostram-se preservados, com núcleos redondos e nucléolos evidentes. Não se observou vacuolização macrogoticular difusa nos hepatócitos.

Figura 19 – Histologia hepática de fêmeas de *C. durissus* ao longo dos status reprodutivos.



Legenda - A) Vitelogênese primária – observar ausência de vacuolização micro e macrogoticular (Aumento de 40X) B) Vitelogênese secundária – observar intensa vacuolização micro e macrogoticular (aumento 20X) B') Aumento de 40X; C) Prenhe (Aumento 40X) asteriscos evidenciam dilatação dos sinusóides (microvasos); D) Pós-Párto (Aumento 20X) Espaço porta evidenciando os ductos biliares dilatados.

1.3.12 Descrição das alterações microscópica do tecido hepático em machos ao longo das estações do ano

Verão

A avaliação microscópica do tecido hepático durante o verão revelou organização das placas hepatocitárias não evidente, com espaço porta íntegro. Os hepatócitos apresentaram discreta vacuolização microgoticular citoplasmática, com núcleos redondos e pequenos

nucléolos evidentes. Os sinusóides foram observados dentro dos padrões da normalidade (Figura 20A).

Outono

A avaliação histológica durante essa estação revelou uma desorganização das placas hepatocitárias. O espaço porta apresentou discretos focos de hiperplasia dos ductos biliares. As demais estruturas foram observadas dentro dos padrões da normalidade. Os hepatócitos exibiram uma discreta vacuolização citoplasmática, com núcleos redondos e pequenos nucléolos visíveis. Os sinusóides estavam dentro da conformação normal (Figura 20B)

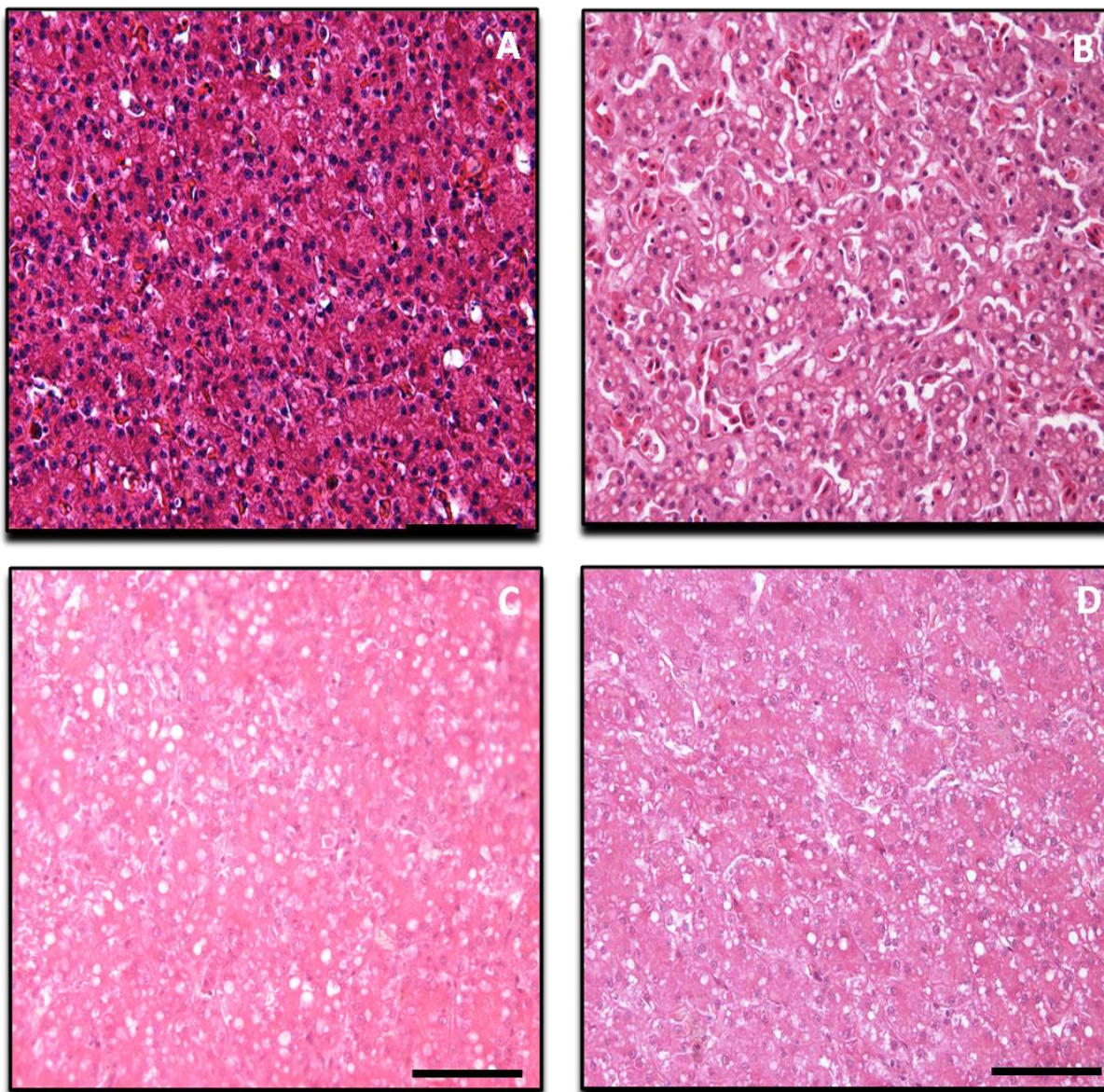
Inverno

A análise histológica revelou organização das placas hepatocitárias pouco evidente. Foram observados discretos focos de hiperplasia dos ductos biliares, porém as demais estruturas do espaço porta apresentaram-se dentro da conformidade. Os hepatócitos exibem discreta vacuolização citoplasmática macro e micro goticular, com núcleos redondos, por vezes com cromatina frouxa e pequenos nucléolos evidentes. Foi observada a presença de raros melanomacrófagos periportais (Figura 20C).

Primavera

A avaliação microscópica revelou organização das placas hepatocitárias pouco evidente. O espaço porta apresentou-se íntegro. Os hepatócitos foram observados preservados, com núcleos redondos e pequenos nucléolos por vezes evidentes. Os sinusóides apresentaram-se dentro dos padrões da normalidade (Figura 20D).

Figura 20 - Histologia hepática em machos de *C. durissus*



Legenda - A) Verão; B) Primavera; C) Outono; D) Inverno . Todas as fotos estão em aumento de 10X. Observar a variação da densidade de vacuolização micro e macroglotular citoplasmáticas.

1.3.13 Alterações renais

Os rins foram avaliados microscopicamente e microscopicamente sob a perspectiva dos custos reprodutivos, ou seja, das possíveis alterações resultantes dos processos reprodutivos em machos e fêmeas de *C. durissus*. As análises tiveram como objetivo primordial revelar as diferenças sazonais das estruturas renais de machos e fêmeas através da histologia básica – coloração hematoxilina/eosina e extração lipídica, para compará-las aos demais resultados já disponibilizados por outros autores. Tais diferenças são oriundas da

variação na quantidade dos grânulos secretores encontrados no epitélio do segmento sexual renal, que alteram a configuração do lúmen das células, evidenciando assim, um processo de hipertrofia do segmento sexual renal.

1.3.14 Descrição da estrutura macroscópica dos rins de *C. durissus*

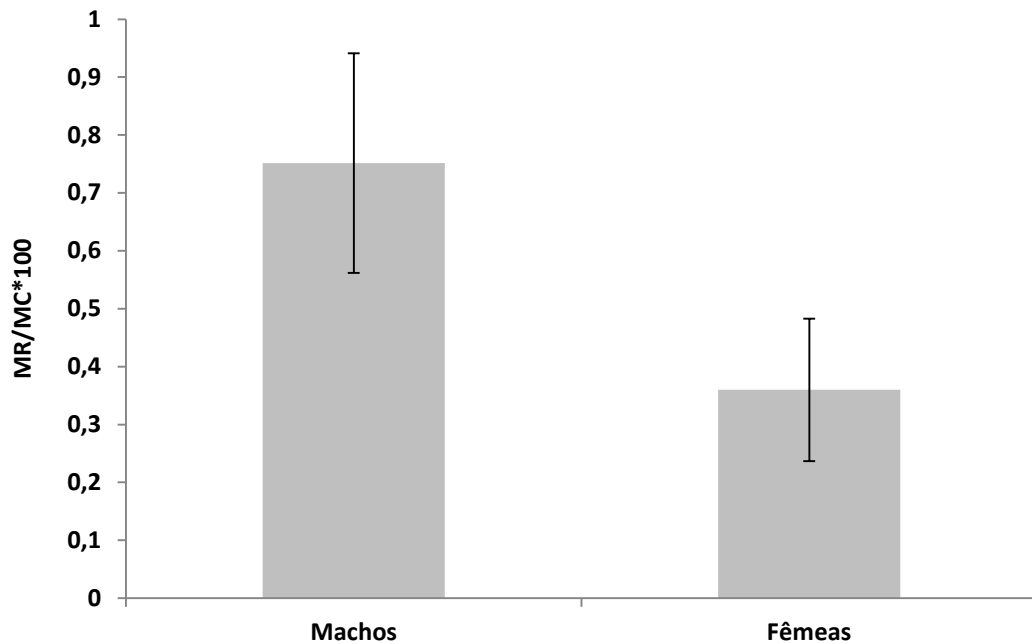
Os valores das médias dos parâmetros biométrico do rim direito de machos e fêmeas está apresentado na tabela 3.

Tabela 3-Valores das médias da biometria do rim direito de *C. durissus*.

Biometria do rim direito (mm)	Machos	Fêmeas
	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão
Largura	9.32 ± 2.0	10.69 ± 2.89
Comprimento	185.83 ± 47.30	152.12 ± 39.28
Espessura	3.13 ± 0.93	2.19 ± 0.62

A média da massa relativa dos rins entre machos e fêmeas de *C. durissus* revelou diferença significativa, (F=97.27; p=0.0001), com machos apresentando média superior, correspondendo à quase 0.8% da massa corpórea (Figura 21).

Figura 21 – Variação das médias da massa relativa do rim de machos e fêmeas de *C. durissus*.

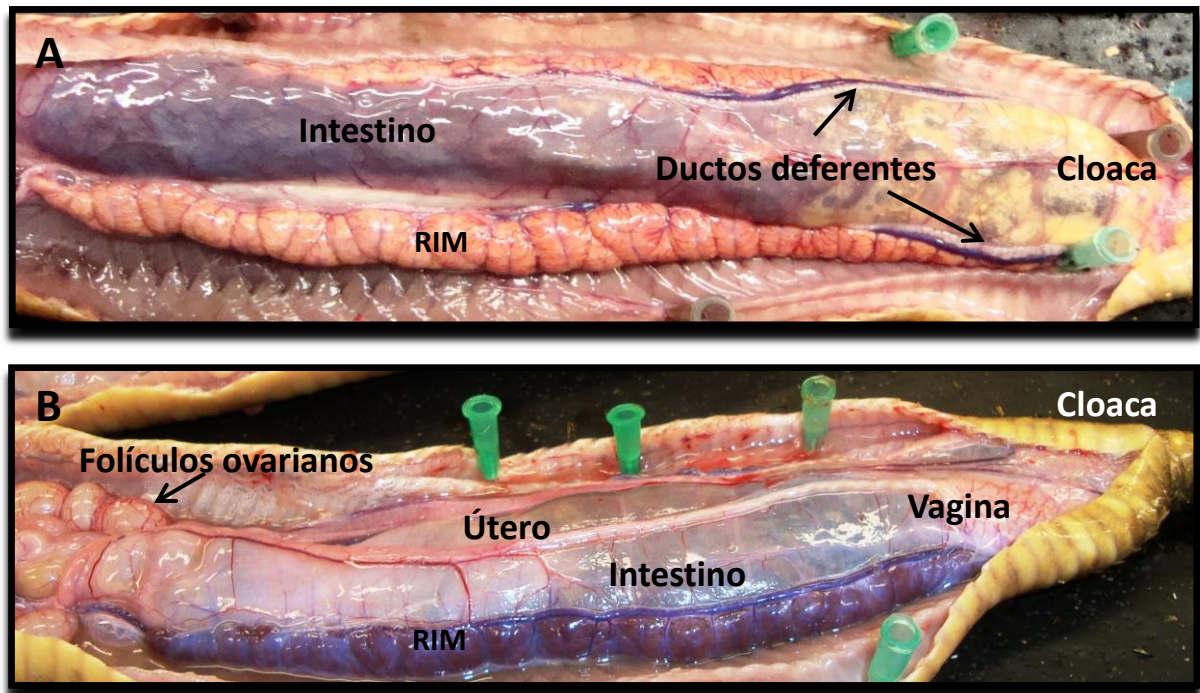


Legenda – As linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão das médias dos valores.

Como descrito para outras espécies de serpentes, o rim das *C. durissus* aqui estudadas, é um órgão alongado longitudinalmente, constituído por lóbulos dispostos transversalmente. Quanto à posição anatômica em relação aos outros órgãos, os rins direito e esquerdo alocam-se na parede ventral da cavidade do corpo e são margeados dorsalmente pela adrenal. Os rins estão em ligeira assimetria, sendo o rim esquerdo aproximadamente 20 milímetros maior que o rim direito (Figura 22).

Nas fêmeas, os rins podem ser observados a partir da cloaca, margeando o útero e alcançando os folículos ovarianos (Figura 22B). Já nos machos, os rins podem ser observados a partir da cloaca, margeando o ducto deferente até a ligação da adrenal com os testículos (Figura 22A)

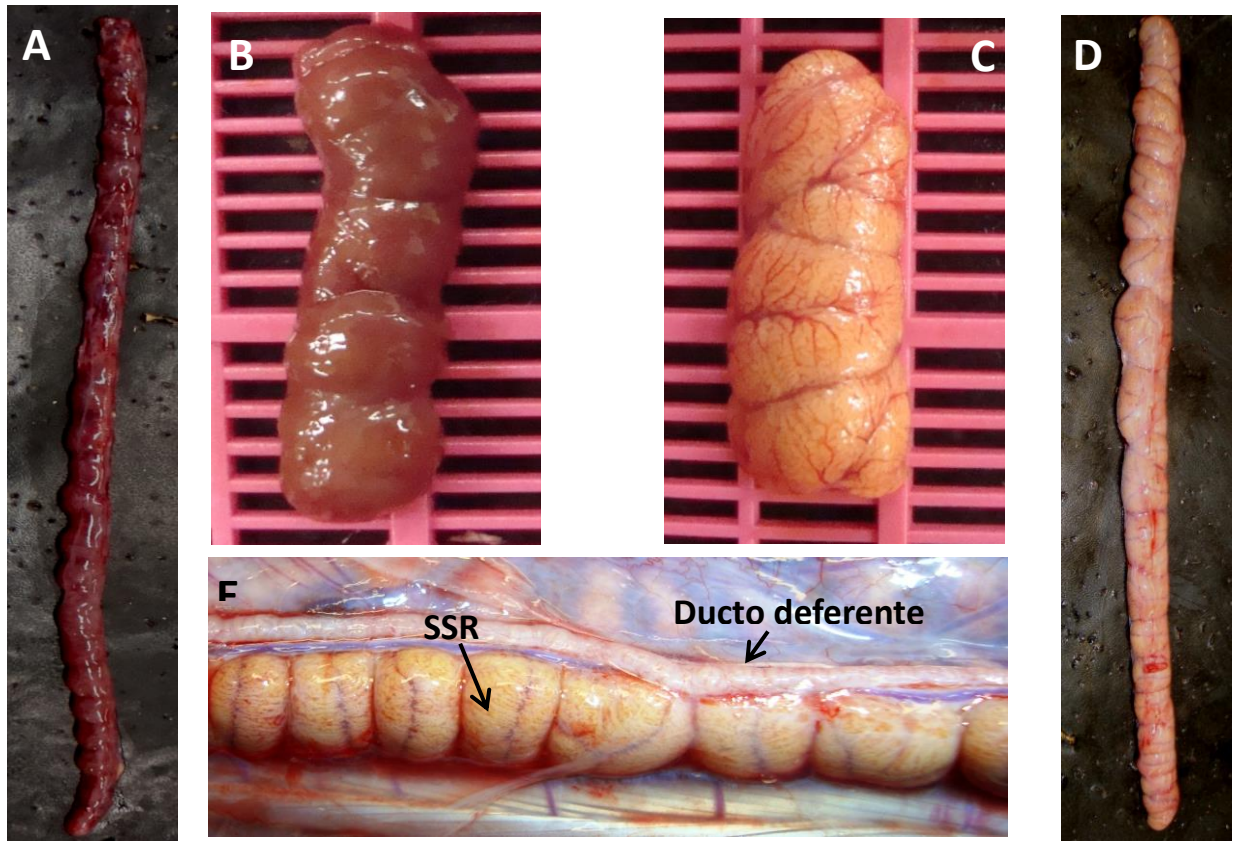
Figura 22 - Foto da anatomia interna de *C. durissus* evidenciando a localização dos rins em relação aos outros órgãos.



Legenda - Fêmea (A) e macho (B).

A coloração varia entre machos e fêmeas. Para as fêmeas a coloração dos rins é avermelhada, semelhante à coloração do fígado e não foram observadas variações sazonais na coloração e na biometria. Contudo, nos rins dos machos observou-se uma coloração bege, principalmente durante o outono, em que a coloração se intensifica ganhando tons de amarelo (Figuras 23 A, B C e D). Durante a estação reprodutiva, os rins dos machos apresentam uma ampliação da lateral das margens dos lóbulos, evidenciando que a mudança de coloração é devida ao espessamento dos túbulos dos néfrons que permanecem agregados ao longo das bordas laterais do rim. Essa mudança estrutural indica a presença do segmento sexual renal, que pode ser observado macroscopicamente (Figura 23E).

Figura 23 – Foto do rim direito dissecado de uma fêmea de *C. durissus*

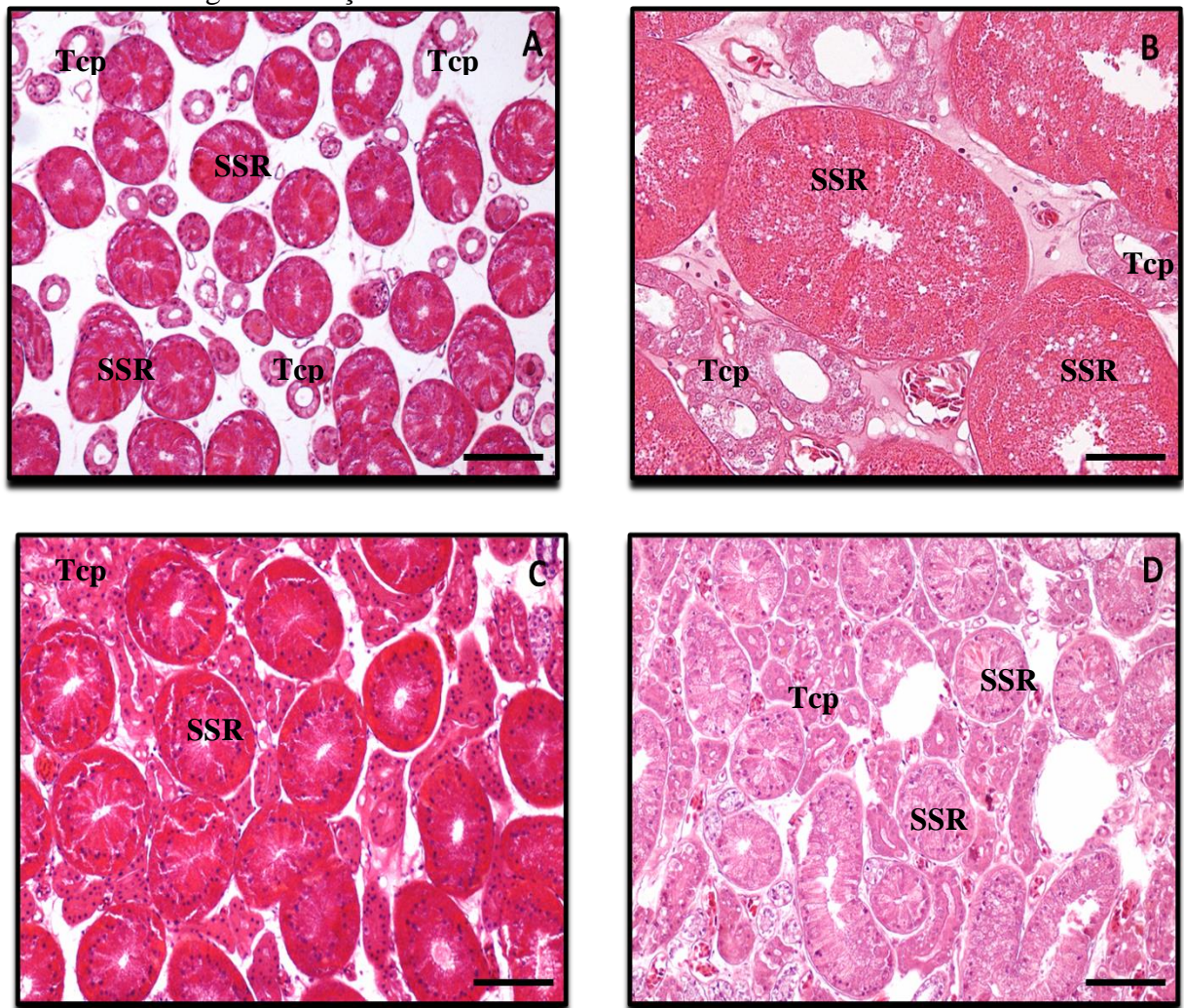


Legenda - (A). Fragmento do rim retirado para confecção de lâminas histológicas (B e C). Detalhe da coloração avermelhada da fêmea (A e B). Foto do rim direito dissecado de um macho de *C. durissus* (D). Detalhe da coloração amarelada do macho (C e D), do ducto deferente enovelado, indicando maturidade sexual e do segmento sexual renal preenchendo a superfície do rim (E).

1.3.15 Variações histológicas dos rins dos machos de *C. durissus*

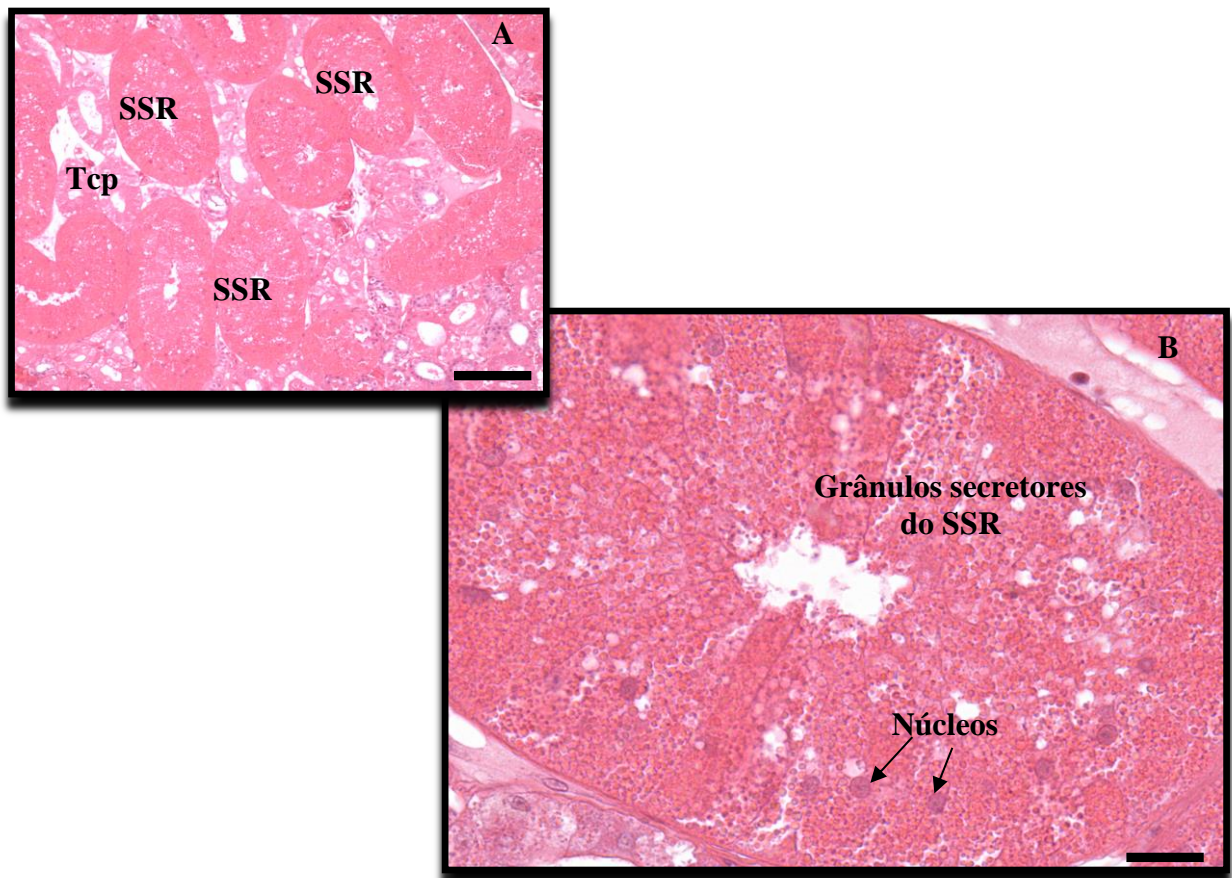
Embora o rim direito dos machos de *C. durissus* tenha apresentado diferenças sazonais quanto à massa relativa e quantidade de lipídeos por grama de tecido, as análises histológicas revelaram características de hipertrofia do epitélio do segmento sexual renal durante todas as estações, como um pequeno volume do lúmen (Figura 24). Durante o outono, contudo, estação na qual são observados os comportamentos de busca por fêmeas, combate e cópula, há um aumento visível da produção de grânulos secretores, preenchendo quase totalmente o citoplasma celular, realçando a hipertrofia do epitélio e a diminuição do volume do lúmen (Figuras 24B e 25). Essa intensa agregação dos grânulos citoplasmáticos é também associada com o aumento da intensidade da coloração histológica básica, sugerindo um conteúdo eosinófilo (Figura 25).

Figura 24 – Histologia do rim direito dos machos de *C. durissus* evidenciando o SSR ao longo das estações do ano.



Legenda - A= Primavera aumento 10X; B=Outono aumento 20X – observar a acentuada hipertrofia do SSR. C= Verão aumento 10X e D = Inverno aumento 10X. Tcp – Túbulo contorcido proximal; SSR – Segmento renal.

Figura 25 – Histologia do rim direito de um macho de *C. durissus*, evidenciando o SSR e os grânulos secretores em máxima atividade no outono.

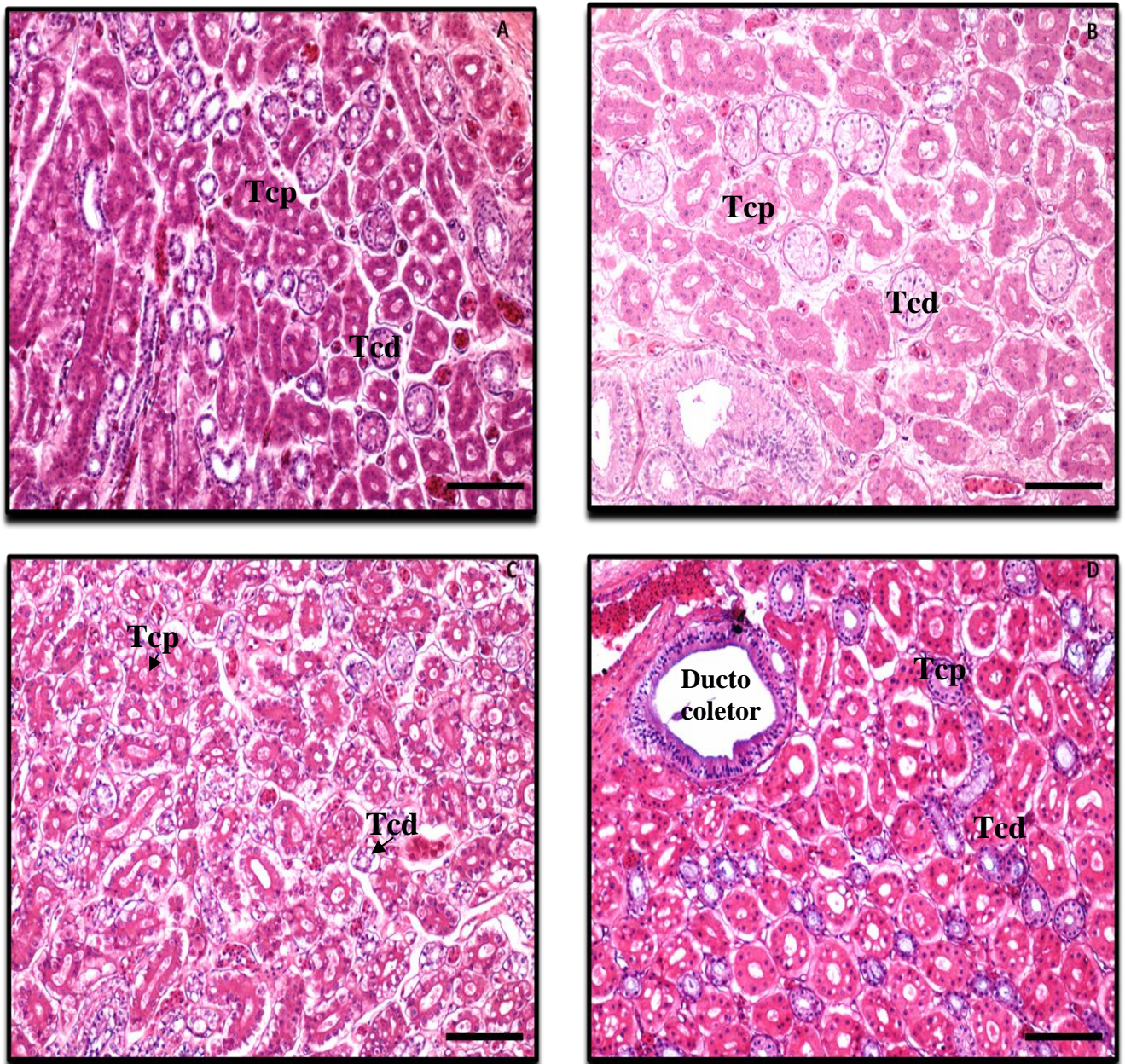


Legenda – Em A aumento de 10X. Em B, com um aumento de 40X, observa-se o aumento dos grânulos secretores do epitélio do segmento sexual renal. SSR – Segmento sexual renal; Tcp – túbulo contorcido proximal; Tcd – túbulo contorcido distal.

1.3.16 Variações histológicas dos rins das fêmeas de C. durissus

Assim como esperado, a avaliação histológica do rim das fêmeas não mostrou diferenças sazonais. Em decorrência da ausência do segmento sexual renal nas fêmeas, o padrão celular em todas as estações permaneceu estável. O volume do lúmen e a altura do epitélio não apresentaram diferenças, tampouco se observou alterações na coloração ao longo das estações (Figura 26).

Figura 26– Histologia do rim direito das fêmeas de *C. durissus* ao longo das estações do ano.



Legenda - A= Primavera; B=Outono; C= Verão e D = Inverno. Observam-se apenas os túbulos contorcidos proximal (Tcp) e distal e (Tcd).

1.4 Discussão

1.4.1 Proporção de indivíduos reprodutivos

A pequena diferença encontrada (10%) entre a proporção de fêmeas não reprodutivas (vitelogênese primária) 40% e fêmeas reprodutivas (em vitelogênese secundária e fêmeas prenhes) 60% em *Crotalus durissus*, corrobora a hipótese de bienalidade do ciclo reprodutivo de muitos crotalíneos que apresentam um padrão de reprodução bienal sazonal (ALDRIDGE, 1979; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; BLEM, 1982; LANGLADA, 1972).

Menos da metade (42.5%) das fêmeas de *C. durissus* da amostra estudada estavam aptas a dar continuidade aos processos reprodutivos e, provavelmente deixar descendentes no verão do mesmo ano e 40% não haviam iniciado aos processos reprodutivos com a deposição gradual do vitelo em seus folículos para então copular, estocar espermatozoide, ovular, fecundar e então parir no verão do ano seguinte. Esse padrão é similar a outros membros do gênero das regiões temperadas, como *C. atrox*, *C. pricei*, *C. scutulatus*, *C. mitchellii*, *C. tigris* e *C. willardi* (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

Tal assertiva é baseada em observações em que aproximadamente metade das fêmeas maduras numa dada população está reprodutiva (ALDRIDGE, 1979; BLEM, 1982). Entretanto, alguns autores consideram que em algumas espécies, o número de fêmeas reprodutivas excede a metade da população, algumas espécies como *Crotalus viridis* possuem variações anuais na proporção de fêmeas reprodutivas e não reprodutivas (BLEM, 1982), dados similares aos encontrados pelo presente trabalho.

Há relatos de viperídeos que se reproduzem anualmente, como documentado para *A. contortrix* e *C. viridis* (DILLER; WALLACE, 1984; FITCH, 1960), porém essas observações são pouco frequentes para viperídeos, parecendo ser mais comum em colubrídeos tropicais (BROWN; SHINE, 2002; MARQUES, 1996; PIZZATO; MARQUES, 2002; SHINE, 1991). Por outro lado, muitas espécies requerem dois à três anos para que as fêmeas completem a maturação dos folículos (WHITE, 2011). Betz (1963) e Metter (1977) reportaram esse padrão de reprodução trienal para *Nerodia rhombifer* e *N. sipedon*, respectivamente.

As diferenças na proporção de fêmeas reprodutivas em muitas espécies de serpentes, sobretudo entre os viperídeos, já suscitou algumas especulações entre herpetólogos, incluindo a hipótese de que os ciclos bienais são determinados geneticamente (SIEGEL; FORD, 1987), entretanto essa hipótese foi refutada por muitos autores que propuseram que a frequência reprodutiva está sob o controle primário da disponibilidade de presas e da estrutura da

população (ALDRIDGE, 1979; BLEM, 1982; DILLER; WALLACE, 1984). Assim, a frequência reprodutiva está diretamente relacionada à quantidade de energia estocada, podendo ser alocada para as demandas dos processos reprodutivos (SHERIDAN, 2004).

1.4.2 Ciclo reprodutivo

Todos os machos de *C. durissus* dissecados apresentaram características de maturidade sexual ao longo dos dois anos de coleta de dados: comprimento rostro cloacal (CRC) superior à 560 mm (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002), ductos deferentes enovelados e opacos (MATHIES, 2011; SHINE, 1980) sugestivo de produção e estocagem de espermatozoides (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004). Esse padrão de ciclo reprodutivo anual para os machos também já foi observado para *Thaminophis sirtalis* (KROHMER et al., 1987); *Tropidoclonion lineatum* (KROHMER; ALDRIDGE, 1988), *Boiga irregularis* (MATHIES, 2010), e para outras inúmeras espécies de colubrídeos e viperídeos de zonas temperadas e tropicais (MATHIES, 2011).

O ciclo testicular de *C. durissus* aqui descrito, tanto a partir do volume quanto a partir de análises histológicas do testículo, corrobora o padrão descrito para a população do sudeste do Brasil (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004), no qual o início da espermatogênese se inicia na primavera com pico no verão e fase quiescente a partir do outono e regressão total do epitélio germinativo observado no inverno. A análise histológica das gônadas é um parâmetro fundamental para a real elucidação das estratégias reprodutivas adotadas pelas serpentes, sobretudo para identificar possíveis variações individuais presentes numa população (MATHIES, 2011).

Machos de *C. durissus* neotropicais apresentam variação do tipo de ciclo espermatogênico. Populações do nordeste brasileiro apresentam um ciclo associado, com pico de produção de espermatozoides ocorrendo na mesma estação em que se observa a cópula - outono (BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012), porém, populações do sudeste do Brasil, iniciam a produção de gametas na primavera e o pico de atividade testicular é observada no verão, evidenciando um ciclo dissociado, já que a cópula nessa população também é observada no outono (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; ALMEIDA-SANTOS, 2005).

As variações do padrão do ciclo testicular podem evidenciar um maior ou menor custo reprodutivo, como demonstrado para as *C. durissus* do nordeste brasileiro, pois um ciclo testicular associado dispensa as estratégias de estocagem e manutenção de espermatozoides viáveis durante uma estação (BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012).

Há uma extensa abordagem sobre as diferenças dos custos associados aos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas na literatura herpetológica, e alguns autores divergem quanto à magnitude dos custos entre os gêneros (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; BONNET, 2011; SHINE, 1980).

Saint-Girons (1982), sugere que em regiões tropicais e equatoriais, as condições climáticas permitem que a espermatogênese ocorra em qualquer período do ano, pois a demanda energética para tal processo é mínima, ao contrário do que ocorre com as fêmeas cuja vitelogenese requer a utilização de uma considerável quantidade de energia – gordura abdominal. Há indícios de que machos de serpentes não requerem um limiar de energia estocada para dar início às atividades reprodutivas (SHINE, 2003). Entretanto, Olsson, Madsen e Shine (1997) inferiram o gasto energético da produção de espermatozoides pela perda de massa corpórea de *Vipera berus* e verificou que há uma perda considerável de massa corpórea justamente durante a espermatogênese que ocorre fora do período dos comportamentos de busca pelas fêmeas – reforçando assim, a hipótese de que o custo da produção de espermatozoides não é trivial quando comparada aos custos totais (energia e risco).

Para os machos de *C. durissus* avaliados, os valores de gordura abdominal são maiores durante o verão, sugerindo que esse estoque energético está disponível tanto, para ser consumido durante o processo espermatogênico que inicia-se na primavera e atinge o pico de atividade durante o verão, quanto para os comportamentos reprodutivos exercidos durante o outono.

Em contraste, a produção do gameta feminino (óvulo) é um componente majoritário dentre o total dos custos reprodutivos para as fêmeas e muitas diferenças das características sexualmente selecionadas entre machos e fêmeas têm sido atribuídas a esta divergência inicial na magnitude dos custos de produção de gametas (CHARNOV 1982; OLSSON; MADSEN; SHINE, 1997; TRIVERS 1972).

Arizona elegans e *Crotalus viridis*, apresentam diferenças de substratos energéticos nos folículos ovarianos entre a vitelogenese primária e secundária. Durante a vitelogenese primária, os folículos ovarianos possuem pouca quantidade de proteína, lipídeos, rastros de cálcio e o tamanho não ultrapassa 6 mm, já no segundo estágio, denominada vitelogenese

secundária, há rápido crescimento dos folículos e das quantidades de proteínas e lipídeos (ALDRIDGE, 1979). Tais dados são congruentes com a mobilização de substratos energéticos encontrados nesse presente estudo, pois os maiores índices hepatossomático e lipossomático foram registrados durante a vitelogênese secundária, seguidos dos menores valores na prenhez.

As *Crotalus durissus* do Brasil, apresentam o padrão de vitelogênese sem a pausa do inverno, obviamente em decorrência da ausência de hibernação e de temperaturas muito baixas ao longo do inverno. Como descrito no presente estudo, o início da vitelogênese ocorre, no final do verão, com os folículos atingindo máximo de tamanho antes da ovulação durante a primavera (ALMEIDA-SANTOS et al., 1997, 2002). Além disso, Almeida-Santos e Orsi (2002) demonstraram que os folículos em vitelogênese primária de *C. durissus* são em média menores que 10 mm e possuem coloração opaca, esbranquiçada e a vitelogênese secundária pode ser inferida a partir de folículos de cor amarelo intenso (vitelo) e maiores que 10 mm, parâmetros também encontrados nas gônadas das fêmeas aqui analisadas.

1.4.3 Alocação de energia para a reprodução

Claramente, o mecanismo de deposição de vitelo nos folículos e o tempo requerido para isso (fim do outono até a primavera), sugerem que um grande “acordo energético” é necessário para os provimentos da vitelogênese e do desenvolvimento embrionário (BLACKBURN, 1994; WHITE, 2011), para a espermatogênese e os custos associados aos comportamentos reprodutivos nos machos (ALDRIDGE; DUVALL, 2002).

Para ambos os sexos, assume-se que o sucesso reprodutivo envolve a habilidade de estocar energia, que por sua vez está ligada à disponibilidade de recursos. A disponibilidade de recursos é considerada fator proximal responsável pelas variações dos aspectos da história de vida dos organismos e vem sendo estudada experimentalmente com manipulações da dieta (SANTOS; LLORENTE, 2001, 2004, 2005; SIEGEL; FORD, 1989).

Pesquisas apontam que de maneira geral, os organismos podem utilizar duas táticas de aquisição de recursos (JONSSON et al., 1997; MILLAR, 1975, 1987). A primeira tática denominada “*capital breeder*”, na qual os organismos acumulam recursos/energia antes do início dos eventos reprodutivos, e contam com a existência de uma assincronia entre o forrageamento e o uso do estoque de tais recursos, Além disso, após o consumo dos recursos

para custear a demanda energética da reprodução, há um período de quiescência reprodutiva (BONNET et al., 1998). A segunda estratégia, descrita como “*income breeders*” os organismos continuam se alimentando durante os eventos reprodutivos, possivelmente em reposta a um aumento da demanda de recursos (JONSSON, 1997).

Esses termos “*capital e income*” breeders, foram difundidos, sobretudo por Xavier Bonnet e colaboradores, que disponibilizaram uma abordagem ectotérmica para tais táticas de aquisição energética e sua respectiva utilização para suprir a demanda reprodutiva e sugeriram que a tática *capital breeder* é adotada por todos os vertebrados ectotérmicos (BONNET et al., 1998, 2000, 2002). Tal tática parece agregar um menor custo para estocar energia do que os indivíduos “*income breeders*” e que essa última estratégia parece ser rara, devido ao incremento do risco de predação durante o forrageamento após a investida reprodutiva (BONNET et al., 1998). Os valores dos índices lipossomático e hepatossomático das *C. durissus* avaliadas evidenciam uma estratégia “*capital*”, pois para os machos os maiores valores foram encontrados no verão, estação que precede a estação de acasalamento, e para as fêmeas os maiores valores foram encontrados durante a vitelogênese secundária seguido de um agudo decréscimo na prenhez.

Uma exceção a essa suposição, parece ser atribuída à *Agkistrodon piscivorous*, que apresenta ciclo bienal e uma pequena diferença na percentagem da massa de gordura abdominal entre fêmeas reprodutivas (2,7%) e não reprodutivas (2,3%). Provavelmente essa espécie se reproduz menos que os demais viperídeos de regiões temperadas (WHARTON, 1966). Entretanto, esse dado foi criticado por alguns autores que mais recentemente reavaliaram tais dados e sugeriram que os estágios reprodutivos possam ter sido sobrepostos, mascarando de alguma forma tais dados (ALDRIDGE et al., 2003).

Há ainda, uma premissa muito controversa na literatura, acerca de uma derivação do custo energético: a limitação da ingestão de itens alimentares durante o período reprodutivo, também considerado um custo oportunista (MADSEN; SHINE, 1993). Shine (1980) descreve que algumas espécies de répteis podem cessar a alimentação durante os processos reprodutivos. Entretanto, muitas informações por ele disponibilizadas são oriundas de animais mantidos em cativeiro (sob condições distintas), o que pode de alguma maneira, influenciar tais dados. Além disso, os dados apresentam muita variação entre os táxons, inclusive entre espécies do mesmo gênero. Gregory e colaboradores (1998) analisaram diversas espécies de serpentes vivíparas e afirmam que há um conflito entre a alimentação e os comportamentos

relacionados à gestação, diante disso, sugerem que algumas delas são anoréxicas durante a prenhez.

Madsen e Shine (2000), demonstram que em *Liasis fuscus*, as fêmeas reprodutivas param de se alimentar por até 3 meses, perdem até 44% da sua massa corpórea e aumentam a mortalidade durante esse período. A porcentagem de fêmeas prenhes alimentadas é 1% (N=117) contra 25% (N=126) das fêmeas não reprodutivas. Já os machos diminuem a taxa de ingestão de alimentos por 6 semanas ao longo da estação reprodutiva e perdem 17% da massa corpórea durante esse período. Zacariotti e Durrant (2006) relatam o encontro de uma fêmea de *Crotalus oreganus* em vitelogênese secundária que acabara de ingerir um coelho. A presa foi evidenciada por Raios-X, entretanto, os autores não disponibilizaram quaisquer outros dados acerca da massa da presa, tampouco o tamanho dos folículos.

Muitos argumentos são sugeridos para explicar a limitação da ingestão de itens alimentares durante o período reprodutivo como o aumento da necessidade de termorregulação para o desenvolvimento embrionário, menor habilidade em capturar presas – devido ao incremento da massa corpórea das fêmeas durante a prenhez, diminuindo, dessa forma, a habilidade de escape de predadores e até mesmo a supressão do apetite fisiológico (GREGORY et al., 1998; SHINE, 1980). Há ainda, a justificativa da limitação do espaço da cavidade abdominal – que durante a vitelogênese e a prenhez permanece praticamente toda ocupada pelos folículos em crescimento e pelos embriões, respectivamente, suprimindo o espaço que poderia ser ocupado por uma presa no estômago (LOURDAIS, 2003).

Curiosamente, a análise do conteúdo estomacal de machos e fêmeas de *Crotalus durissus* do presente trabalho, revelou zero por cento de indivíduos alimentados, porém 95% deles apresentaram conteúdo intestinal constituído de pêlos pretos – sugestivo de roedores silvestres. Esse dado é incomum, pois muitos outros trabalhos com a mesma espécie demonstraram vários táxons de presas (SALOMÃO et al., 1995, 1998; TOZZETI, 2006). Provavelmente, devido aos animais serem capturados por terceiros em encontros ocasionais (Recepção de Serpentes do IB), e por apresentarem conteúdo intestinal já totalmente digerido, algumas das serpentes amostradas poderiam estar em atividade de forrageamento e foram avistadas e capturadas antes de encontrarem uma presa.

Talvez esse aspecto seja elucidado quando mais trabalhos de história natural sejam feitos com acurácia tanto para os dados de dieta quanto para os dados reprodutivos –

esclarecendo de fato, se a restrição alimentar se dá ao longo da vitelogênese ou se está restrita à prenhez para as fêmeas e se machos se alimentam ou não durante a estação reprodutiva.

1.4.4 Gordura abdominal

A estocagem de gordura abdominal em serpentes é encontrada no terço posterior do abdômen, é às vezes é extensa o suficiente para cobrir todos os outros órgãos, quando a serpente é aberta ventralmente (POND, 1978). Volsoe (1944) sugeriu que a massa de gordura também auxilia na locomoção pois mantém arredondado o contorno do corpo, outra possibilidade é que a locomoção se torna mais eficiente com aumento da concentração de massa sobre as escamas ventrais, diminuindo o atrito com o substrato. A gordura abdominal é um suprimento para as demandas metabólicas mesmo em indivíduos desidratados e com pouca massa corpórea, porém, o seu excesso pode ocasionar um sobrepeso, gerando uma limitação da locomoção e outros distúrbios metabólicos, inclusive alterações gonadais (SHERIDAN, 2004).

Nas *C. durissus* dissecadas, a gordura abdominal foi encontrada sobretudo sob os órgãos reprodutivos de machos e fêmeas, não se estendendo para os demais órgãos localizados mais cranialmente.

O índice lipossomático (quantidade relativa de gordura abdominal) entre as fêmeas variou significativamente entre os estágios reprodutivos, com menores níveis durante a prenhez e maiores níveis ao longo da vitelogênese secundária – fato que reitera a hipótese de que não há reprodução na ausência de reservar energéticas (AUBRET et al., 2002). O valor relativo da gordura abdominal entre a vitelogênese primária e secundária pode variar de 5 à 6 vezes - como descrito para *Crotalus horridus* e *Nerodia rhombifer* (GIBBONS, 1972) e (ALDRIDGE et al., 2003), respectivamente.

Um dos primeiros relatos acerca da relação da gordura abdominal e a reprodução em serpentes, foi reportada por Vainio (1930) em *Vípera berus* que apresentou um acentuado decréscimo da gordura abdominal durante a prenhez e atingiu os menores níveis depois da parturição. Variações do estoque de gordura foram descritas por Saint Girons (1957) em *Vípera aspis* onde fêmeas que apresentavam menos de 10% de gordura em relação à massa corpórea antes hibernação durante o inverno, não se reproduziam na primavera seguinte.

Em *Thamnophis sauritus* a massa de gordura corporal declina com o desenvolvimento dos folículos ovarianos (FOX; DESSAUER, 1959). Conclusões semelhantes foram foi apresentadas por Tinkle (1962) em *Crotalus atrox* cujo armazenamento de gordura é muito

maior em fêmeas que se reproduziram em um dado verão do que naquelas que haviam se reproduzido no verão anterior. Dessa forma essa diferença impõe a bienalidade do ciclo reprodutivo, indicando que o armazenamento de grandes reservas de gordura é essencial para reprodução. *Crotalus horridus*, *C. viridis* e *Vipera berus* apresentaram esse mesmo padrão de consumo de gordura abdominal ao longo das etapas do repertório reprodutivo, revelando maiores valores no início da vitelogênese e atingindo menores níveis após a parturição (GIBBONS, 1972; GREGORY, 1988; MACCARTNEY; NILSON, 1981), corroborando os dados das *C. durissus* aqui apresentados.

Em um trabalho experimental com *Uta stansburiana*, Hahn e Tinkle (1965) eliminaram cirurgicamente a gordura abdominal em um grupo de fêmeas, em outro grupo, as fêmeas foram histerectomizadas e o grupo controle foi submetido à incisão cirúrgica, porém nada foi retirado desse último grupo. Os resultados demonstraram que fêmeas sem os estoques de gordura abdominal apresentaram altas incidências de folículos atrésicos (não fecundados) além de retardo ou inibição do crescimento folicular. No grupo de fêmeas histerectomizadas, a mobilização dos corpos de gordura não ocorreu, mantendo-se inalterados. Já no grupo controle todas as etapas do repertório reprodutivo ocorreram normalmente. Resultados semelhantes foram encontrados por Smith (1968) em *Ameiva festiva* e *Ameiva quadrilineata*.

Os machos de *C. durissus* do presente estudo, apresentaram oscilações significativas da quantidade de gordura abdominal, com os maiores valores de gordura abdominal observados durante o verão estação na qual observa-se o pico da espermatogênese e estação que precede a época reprodutiva (outono), sendo esse padrão evidenciado em algumas espécies (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; AUBRET; BONNET; SHINE, 2002).

Assim, para os machos, a energia estocada em gordura abdominal está disponível para ser utilizada na produção de espermatozoides, desenvolver o segmento sexual renal, para custear a busca ativa pelas fêmeas receptivas e realizar os rituais de combate ao longo da estação reprodutiva, período em que observa-se uma nítida diminuição dos níveis de gordura abdominal. Supõem-se também que durante a esse período, os machos diminuem a frequência alimentar, por estarem engajados em comportamentos de busca por fêmeas e corte, que perpetuam a espécie (ALDRIDGE; DUVALL, 2002).

1.4.5 Fígado – Lipídeos, proteínas e alterações histológicas

Muitos estudos estabelecem um índice lipídico, que pode ser calculado como sendo a razão entre a massa de gordura abdominal e a massa corpórea ou por extração dos lipídeos totais dos tecidos previamente secos, dividido pelo peso seco da massa corpórea (SHERIDAN, 1994). Porém, o valor lipídico da gordura abdominal, inferido pelos métodos acima citados, raramente excedem 50% do total de lipídeos estocados, não sendo um bom estimador da quantidade absoluta de lipídeos disponíveis. Além disso, há indícios de que os lipídeos da gordura abdominal não são estáveis, então a estocagem ou a utilização dos lipídeos pode não refletir o montante de gordura estocado previamente (DERICKON, 1974, 1976).

Ainda, deve-se considerar que esse índice (gordura abdominal=lipídeos totais) é mais eficiente para os machos, já que a correlação mostrou-se positiva para muitas espécies (BONNET; NAULLEAU, 1996) já para as fêmeas esse parâmetro será eficiente somente se levado em consideração os diferentes status reprodutivos, pois a vitelogênese e a prenhez podem mascarar a condição corpórea das fêmeas reprodutivas (SANTOS; LLORENTE, 2004). Diante disso, a extração lipídica mostra-se uma ferramenta mais precisa para mensuração dos parâmetros energéticos de machos e fêmeas.

Os lipídeos representam um eficiente mecanismo bioquímico por possuir uma alta concentração energética ocupando pouco espaço dos organismos. Assim como em outros animais, os répteis utilizam as reservas lipídicas provenientes dos corpos de gordura, para suprir diferentes demandas energéticas, incluindo crescimento, manutenção somática e reprodução (DERICKSON, 1976; SHERIDAN, 1994).

A extração dos lipídeos totais e de proteínas totais do fígado de répteis, bem como a avaliação histológica do tecido hepático, são metodologias mais refinadas para mensurar o custo energético da reprodução, nos permitindo testar como a dinâmica de lipídeos pode influenciar a produção da prole (SANTOS; LLORENTE, 2004). Além disso, sabe-se que o processo vitelogênico exige a participação do fígado, que por sua vez, apresentará alterações de massa (índice hepatossomático), alterações na concentração de lipídeos e proteínas nos diferentes status reprodutivos em ambos os sexos (BONNET, 2011). Entretanto, tais avaliações se restringem à poucas espécies das regiões temperadas.

Os dados de extração dos lipídeos totais do fígado das fêmeas de *C. durissus* do presente trabalho são muito similares aos valores do índice lipossomático, bem como os valores do índice hepatossomático, corroborando dessa forma, a assertiva de Cale e Gibbons (1972), mostrando-se um excelente estimador lipídico, além de evidenciarem a mobilização

dos substratos energéticos durante as diferentes etapas reprodutivas. O processo vitelogênico exige altos valores de gordura abdominal estocada, a qual é consumida ao longo do desenvolvimento embrionário, refletindo alteração do índice hepatossomático em decorrência da transformação metabólica (gordura → vitelogenina → vitelo) que ocorre no fígado (ALDRIDGE, 1979; BONNET, 2011; MATHIES 2011).

Já os machos apresentaram valores de lipídeos totais do fígado um pouco maiores que os valores indicados pelo índice lipossomático, sugerindo que os lipídeos provenientes do tecido hepático talvez sejam menos utilizados ao longo da estação reprodutiva, pois os valores do índice hepatossomático não revelaram variações significativas ao longo do ano.

O valor das proteínas totais do fígado, para ambos os sexos, não variou significativamente, fato que sugere que fígado não é utilizado como fonte de energia para o processo reprodutivo em *C. durissus*, diferentemente do que parece ocorrer em fêmeas do lagarto *Takydromus tachydromides*, que apresenta um acentuado declínio da massa do fígado, sobretudo durante o desenvolvimento embrionário da segunda e terceira ninhada, ao passo que para a primeira ninhada, o valor da gordura abdominal declina significativamente (TELFORD, 1970). Esses resultados sugerem as duas fontes energéticas (gordura abdominal e substratos do fígado) para custear a reprodução da referida espécie, que se reproduz anualmente.

Em *Sceloporus jarrovi*, há um aumento do índice hepatossomático antes do início da vitelogênese e há um aparente declínio desse índice até a parturição, ao passo que em machos tais variações não foram encontradas nem antes da espermiogênese (maturação dos espermatozoides), tampouco depois. Observou-se também que a gordura abdominal atinge maiores níveis antes da hipertrofia do fígado – indicando, dessa forma, que as reservas lipídicas são estocadas primeiramente em gordura abdominal e posteriormente são mobilizadas para o fígado, para serem então transformados em vitelo (GOLDBERG, 1972).

Populações de *Natrix maura*, um colubrídeo da Península Ibérica, foi intensamente estudado sob o ponto de vista da energética da reprodução (SANTOS; LLORENTE, 2000, 2001, 2004, 2005), com dados ecológicos e dos valores da extração dos lipídeos totais de diferentes tecidos dos espécimes - os quais auxiliaram a compreensão da contribuição energética desses tecidos na biologia reprodutiva da espécie. A dinâmica lipídica de *Natrix maura* revelou muitas diferenças entre machos e fêmeas, como por exemplo, uma maior quantidade de lipídeos da carcaça (músculos e ossos sem a pele e vísceras) foi encontrada nos machos, supostamente em decorrência da procura prolongada pelas fêmeas que exige um grande deslocamento. As diferenças encontradas nos rins (maiores valores lipídicos) podem

ser atribuídas à atividade do segmento sexual renal (ALDRIDGE et al., 2011; NILSON; ANDRÉN, 1982). Em contraste, as fêmeas apresentaram maiores concentrações de lipídeos na gordura abdominal e no fígado (SANTOS; LLORENTE, 2004). *Agkistrodon piscivorus* também apresenta esse mesmo padrão diferencial entre machos e fêmeas (SCOTT et al., 1995).

Duarte e Laporta-Ferreira (1990) avaliaram alguns aspectos das reservas energéticas em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* e verificaram que a quantidade de lipídeos no fígado mostrou-se mais elevada durante a primavera em *C. durissus* e no final do verão para *B. jararaca*. Os valores das proteínas plasmáticas em *B. jararaca* não se alteraram durante os meses avaliados, já para *C. durissus* o valor plasmático das proteínas foi menor em março. Contudo, tais autores não levaram em consideração a bienalidade do ciclo em ambas as espécies, tampouco a variação sexual, tornando os referidos dados inconclusivos sob a perspectiva do custo energético da reprodução.

A fonte mais significativa de informações acerca do fígado reptiliano foi disponibilizada por Fenton Shaffner, o qual concluiu um capítulo completo no livro *Biology of the Reptilia – Visceral organs*, de Carl Gans, 1998.

O fígado dos répteis é muito similar em estrutura e função aos demais vertebrados – é o maior órgão visceral, e o que possui conformação mais diferenciada pois segue a conformação da cavidade visceral dos diferentes grupos de répteis (SHAFFNER, 1998).

Neto et al. (2009) avaliaram os órgãos de *Boa constrictor* por meio de ultrassonografia e descrevem o fígado como uma estrutura “fusiforme”, porém nada mais atribuem à esse órgão. Os hepatócitos dos répteis são equivalentes aos hepatócitos dos vertebrados no geral, exceto pela presença dos melanomacrófagos. Os melanomacrófagos foram encontrados apenas em dois espécimes de *C. durissus*. Tais células possuem diversas funções incluindo síntese de melanina, fagocitose e neutralização de radicais livres (SANTOS et al., 2009; SHAFFNER, 1998). De acordo com Frye (1991), os melanomacrófagos são abundantes em anfíbios e répteis, no entanto, em serpentes tal abundância não é observada (HACK; HELMY, 1964). Em cágados *Phrynophis geoffroanus* foram encontrados diversos centros de melanomacrófagos dispersos pelo parênquima hepático (SANTOS et al., 2009). Nas *C. durissus* nas quais foram encontrados melanomacrófagos, tais estruturas localizavam-se no espaço porta e não foi possível estabelecer quaisquer relações entre função de tais estruturas com as demais características do tecido hepático ou com a condição corpórea dos indivíduos, fazendo-se necessário uma investigação mais acurada a respeito da presença dos melanomacrófagos em serpentes.

Inoportunamente, as avaliações histológicas do tecido hepático sob a óptica da energética da reprodução em répteis é praticamente inexistente, sendo a maioria dos trabalhos disponíveis, referentes às alterações hepáticas em decorrência das diferenças entre períodos de alimentação, jejum, intoxicação alimentar, algumas patologias ou são apenas uma descrição morfofuncional do órgão (HARTLEY, 1993; SANTOS et al., 2009; STARCK; BEESE, 2002; STARCK et al., 2007).

A avaliação por microscopia eletrônica do fígado das fêmeas de *Sceloporus jarrovi* revelou uma vacuolização macrogotigular (esteatose) mais severa em fêmeas do que em machos, sobretudo antes e durante a vitelogênese (GOLDBERG, 1972). Em *Trimerosuros flavoviridis* o fígado aumenta em tamanho durante a vitelogênese, ao mesmo tempo em que foram encontrados o maior número de vacuolização macrogoticular – tal característica não foi observada em fêmeas imaturas. Além disso, tais achados não foram observados em fêmeas imaturas (YOKOYAMA; YOSHIDA, 1994). Em gekkos, o fígado das fêmeas apresenta mais lipídeos durante a vitelogênese (JI; WANG, 1990).

As *C. durissus* em vitelogênese secundária apresentaram uma grande quantidade de vacuolização macrogoticular, ao passo que fêmeas em vitelogênese primária, tal característica não sobressai nos cortes histológicos – corroborando os dados de Yokoyama e Yoshida (1994). Nessa hipótese, a mobilização dos substratos energéticos revela que alterações hepáticas que podem ser atribuídas ao processo vitelogênico (SHERIDAN, 2004). Fêmeas prenhes além de apresentaram o processo de vacuolização menos evidente, já que durante essa fase, o vitelo não está sendo mobilizado a partir do fígado, também apresentaram características sugestivas de incremento da taxa metabólica como a ectasia sinusoidal difusa, para aumentar o fluxo sanguíneo durante essa fase. Esse incremento metabólico já foi sugerido por Birchard et al. (1984) em fêmeas de *Tahminophis sirtalis* as quais apresentam uma maior taxa de consumo de oxigênio durante o desenvolvimento embrionário.

A única fêmea pós-parto analisada (dentro da amostra apenas uma fêmea apresentou o oviduto pregueado – sugestivo de parturição recente, durante o período de recrutamento dos filhotes) revelou ausência de vacuolização macrogoticular, porém, discretos focos de hiperplasia de ductos biliares foram encontrados. Tal característica talvez esteja relacionada com uma possível infecção por parasitas supostamente encontrados nessa amostra – porém essa suposição deve ser melhor investigada.

Dentre os machos de *C. durissus* cujo fígado foi analisado histologicamente, não foi possível encontrar diferenças entre as estações acerca da vacuolização macrogoticular, sendo todas as amostras caracterizadas por uma discreta à moderada vacuolização citoplasmática –

sugerindo dessa forma, que o tecido hepático não sofre alterações em decorrência dos processos reprodutivos. Contudo, não foram encontrados na literatura consultada quaisquer parâmetros dessa abordagem para os machos, logo, tal conclusão deve ser aceita com cautela.

1.4.6 Rins– Lipídeos e segmento esexual renal

Os caracteres sexuais secundários desenvolvidos por machos na estação reprodutiva podem agregar uma vantagem evolutiva na seleção sexual, e conseqüentemente, agregam um custo na elaboração e manutenção desses caracteres. Um dos mais proeminentes caracteres sexuais secundários é o segmento sexual renal, o qual constitui-se de uma porção especializada do néfron, localizada na região terminal ou pré-terminal (túbulo contorcido distal) e presente em todos os machos de Squamata (ALDRIDGE et al., 2011; FOX, 1977).

O SSR é caracterizado por uma única camada colunar no epitélio, com núcleo basal e citoplasma preenchido por grânulos secretórios (KROHMER et al., 2004; SEVER et al., 2002). O número e densidade destes grânulos no citoplasma variam individualmente e de acordo com o estado hormonal das espécies (BISHOP, 1959; FOX, 1977).

Os rins das serpentes vêm sendo estudado há muitos anos, e a ligação entre a reprodução em machos e o metabolismo dos rins, também tem recebido mais atenção nas últimas décadas (ALDRIDGE et al., 2011; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2008).

O ciclo testicular, geralmente está relacionado com o aumento do segmento sexual renal na época reprodutiva (SCHUETT et al., 2002; SEVER et al., 2002). Essa premissa é suportada pelos dados referentes à variação do volume testicular em *C. durissus*. O volume testicular mostrou-se significativamente maior durante o verão e o outono, período em que as médias da massa relativa do rim e a quantidade de lipídeos renais estão maiores, além de evidenciar menores volumes durante o inverno. *Nerodia rhombipher* apresentou os menores valores de diâmetro do segmento sexual renal concomitantemente aos menores valores de gordura abdominal, sugerindo a utilização de reservas energéticas para o metabolismo de tal estrutura (ALDRIDGE et al., 2003).

A hipertrofia do segmento sexual renal (SSR) geralmente está associada com secreção andrógena e o processo da espermatogênese (BISHOP, 1959; KROMER, 2004; SANYAL; PRASAD, 1966; WEIL, 1984) de forma a ser considerada essencial para a atividade de acasalamento. Em função disso, Schuett et al. 2002, propõem que o eixo Hipotalâmico-Pituitário-Gonadal (HPG), seja referido em machos de Squamata como Hipotalâmico-Pituitário-Gonadal-Renal (HPGR). Inúmeros trabalhos, no entanto, ao descreverem o ciclo reprodutivo de várias

espécies de Squamata, não relacionam o ciclo secretório do SSR ao ciclo reprodutivo (espermatogênese e acasalamento), ficando principalmente restritos à morfometria das gônadas (BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012). Outros ainda descrevem o SSR, porém não o relacionam diretamente aos principais fases do ciclo espermatogênico (VALVERDE et al., 2005). Para as *C. durissus* avaliadas, fica evidente a relação entre os comportamentos sexuais realizados durante a estação reprodutiva e o aumento da atividade secretória dos grânulos do segmento sexual renal, já para a atividade espermatogênica o SSR parece não relacionar-se diretamente, já que no outono, os testículos apresentam características de início do processo de regressão testicular.

Em *S. mikanii*, o SSR apresenta características de intensa atividade metabólica durante a estação reprodutiva, ao contrário dos testículos que durante esse período apresentam um decréscimo de atividade. (ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2012). Esses dados reforçam a idéia de que o ciclo do SSR é um parâmetro de fundamental importância para elucidar as estratégias reprodutivas e, conseqüentemente, avaliar os custos associados à tais estratégias.

O aumento significativo na quantidade de lipídeos ao longo da estação reprodutiva (outono) da referida espécie, o aumento da massa relativa dos rins e a histologia dos néfrons, evidenciam as alterações sofridas pelos rins, e indicam custos associados ao metabolismo dessa estrutura. Assumindo que a massa relativa do rim reflete a quantidade de energia investida no desenvolvimento e na manutenção do SSR, os dados sugerem que o desenvolvimento do SSR representa um custo energético substancial para o macho, que pode ser igual, ou em algumas espécies até maior que os custos energéticos requeridos na espermatogênese (ALDRIDGE et al., 2011).

Muitas funções têm sido propostas para as secreções do SSR, tais como nutrição e ativação dos espermatozoides (BISHOP, 1959), e participação na estocagem de esperma pelas fêmeas, auxiliando no armazenamento e especialmente na formação de um plug copulatório como observado em Natricinae e Viperidae (ALDRIDGE et al., 2011; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; FOX, 1977; MARINHO et al., 2008)

Além disso, a hipertrofia do SSR estaria de alguma forma relacionada com os comportamentos sexuais tais como combate, corte e guarda copulatória. (ALMEIDA-SANTOS et al., 1999). As alterações sazonais encontradas nos espécimes dissecados suportam essa hipótese, pois a maior concentração de grânulos secretores do SSR foi encontrada somente durante o outono, bem como a maior concentração de lipídeos no tecido renal e ao aumento da massa relativa do rim direito dos machos.

Como já estabelecido, o SSR não foi identificado nas fêmeas de *C. durissus*, no entanto, estudos experimentais revelaram que o SSR por ser estimulado por andrógenos (KRHOMER,

2004). Em *Spillotes pullatus*, os néfron das fêmeas (maduras ou imaturas) se assemelham ao dos machos imaturos, uma vez que as fêmeas não apresentaram nenhuma porção renal hipertrofiada em função do ciclo reprodutivo (MUNIZ-DA-SILVA, 2012).

CAPÍTULO 2 - A SAZONALIDADE REPRODUTIVA DE *CROTALUS DURISSUS* (SERPENTES, VIPERIDAE) IMPÕE UM CUSTO REPRODUTIVO DIFERENCIADO ENTRE MACHOS E FÊMEAS?

2.1 Introdução

A variação temporal das estratégias reprodutivas e das alterações comportamentais e fisiológicas envolvidos nos padrões de história natural de vertebrados são aspectos centrais para qualquer tentativa de inferir os fatores responsáveis e as pressões evolutivas que influenciaram a determinação dos sistemas de acasalamento das espécies (GERVASI et al., 2006; MADSEN; SHINE, 1993).

Os sistemas de acasalamentos e a sazonalidade dos eventos reprodutivos têm sido estudados em diferentes grupos taxonômicos (RIVAS; BURGHARTD, 2005). Para a maioria das espécies de vertebrados, a época do acasalamento coincide com a ovulação, seguida imediatamente da fertilização, gestação e nascimento da prole. O consenso geral é que a causa final para o *timing* do ciclo reprodutivo é a otimização da sobrevivência da prole em decorrência das condições favoráveis do ambiente como, por exemplo, temperatura e abundância de presas (ALDRIDGE; DUVALL, 2002).

Em muitas outras espécies, contudo, o acasalamento é temporalmente separado da produção da prole, com ovulação, fertilização e parturição ocorrendo em estações distintas (BIRKHEAD; MØLLER, 1993; MATHIES, 2011). Nestes animais, que incluem muitas espécies de serpentes, a estação de acasalamento não coincide com a estação da ovulação e fertilização que podem ocorrer meses depois, tornando a estocagem de espermatozoides obrigatória para as fêmeas e machos (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; SCHUETT, 1992).

A separação temporal da época de acasalamento da reprodução (nascimento da prole) sugere que o acasalamento representa uma significativa porção dos custos reprodutivos. Tais custos estão na dificuldade de encontrar parceiros, nas exigências fisiológicas do estro, na determinação da aptidão de potenciais companheiros, e da predação associada ao período acasalamento (ALDRIDGE; BROWN, 1995; GLAUDAS; RODRIGUEZ-ROBLES, 2011).

Os ciclos reprodutivos dos répteis requerem mudanças regulares integradas em sua ecofisiologia, que são controladas por fatores intrínsecos - metabolismo das gônadas e fatores extrínsecos - temperatura, umidade, alimento (FITCH, 1982; MATHIES, 2011). Modificações coordenadas da morfologia, fisiologia e condutas comportamentais das espécies de serpentes

são observadas em machos e fêmeas durante o ciclo reprodutivo (ALMEIDA-SANTOS, 2005; AUBRET et al., 2002; DENARDO; TAYLOR, 2011; JANEIRO-CINQUINI, 2004), sobretudo para as espécies com ciclos reprodutivos marcadamente sazonais (BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; KING; DUVALL, 1990; MATHIES, 2011; ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2012).

O sistema de acasalamento adotado pela maioria das serpentes Crotalinae é o *Prolonged Mate Searching Polygyny – busca prolongada pelas fêmeas*, na qual os machos procuram ativamente por fêmeas receptivas, cortejam e copulam com várias fêmeas durante a estação de acasalamento (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; DUVALL, 1992). As alterações comportamentais exigidas ao longo dos processos reprodutivos – como a procura prolongada pelas fêmeas e a separação sazonal entre a ovulação/fertilização e a cópula, podem revelar padrões de atividade diferenciados entre machos e fêmeas de acordo com as variações sazonais do repertório do sistema de acasalamento exercido pelas espécies (ALDRIDGE; BROWN, 1995; ALDRIDGE; DUVALL, 2002; BAUENS; THOEN, 1981; BRODIE, 1989; MARQUES et al., 2001; MARQUES et al., 2006; MARQUES et al., 2009).

Assim, para os machos, as mudanças fisiológicas e comportamentais ligadas ao período reprodutivo estão intimamente relacionadas ao repertório do sistema de acasalamento adotado (ALDRIDGE; DUVALL, 2002) e como resultado desse sistema de acasalamento, e das mudanças fisiológicas associadas a esse sistema de procura prolongada pelas fêmeas, há um incremento na taxa de atividade, deslocamento e conseqüentemente, um aumento da exposição aos predadores potenciais – mamíferos, aves, outras serpentes e lagartos (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; BONNET et al., 1999; KLAUBER, 1972), aumentando assim, o risco de morte durante esse período.

Para algumas espécies de serpentes, os machos exibem competição intraespecífica evidenciada em rituais de combate com a finalidade de acessar fêmeas receptivas que liberam partículas de feromônios (vitelogenina) no ar (CREWS; GARSTKA, 1982) Tal comportamento incrementa os custos de sobrevivência dos machos associados ao período reprodutivo (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; CARPENTER, 1984; PIZZATTO; MAFIO; ALMEIDA-SANTOS, 2006).

Rituais de combate em *C. durissus* foram reportados durante o outono, quando há um pico de atividade relacionada à estação reprodutiva (ALMEIDA-SANTOS et al., 1995; ALMEIDA-SANTOS, 2005; LANGLADA, 1975). Almeida-Santos et al. (1998), descrevem os comportamentos realizados durante os rituais de combate para a disputa de fêmeas

receptivas para cópula e também de competição de itens alimentares em cativeiro – ambos comportamentos observados durante a estação reprodutiva – no outono.

Crotalus durissus, bem como a maioria de serpentes viperídeas, possui um ciclo reprodutivo sazonal, no qual o início da deposição de vitelo nos folículos ovarianos ocorre no final do verão, a cópula é observada no outono, a estocagem de espermatozoides ocorre durante o inverno e o término da deposição de vitelo nos folículos ovarianos, a ovulação e a fertilização acontecem na primavera e, por fim, a parturição é observada ao final no verão (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997). Em decorrência do longo período de deposição do vitelo nos folículos ovarianos (fim do verão até primavera), fêmeas vitelogênicas e fêmeas prenhes podem apresentar um padrão de atividade influenciado pelas exigências metabólicas dos múltiplos folículos em crescimento: maior massa corpórea, menor habilidade em se locomover e maior necessidade de termorregulação, aspectos que as tornam mais facilmente avistadas e predadas (KING; DUVALL, 1990; MARQUES; PIZATO; ALMEIDA-SANTOS, 2013).

Por outro lado, há evidências para alguns répteis, de que fêmeas prenhes se deslocam menos, em menor velocidade e tornam-se crípticas quando comparadas com fêmeas não prenhes e machos adultos, (BAUWENS; THOEN, 1981; SECOR, 2002). Essa redução na atividade pode estar vinculada às limitações impostas pela gestação (KING; DUVALL, 1990) e parece ser um comportamento típico para viperídeos para reduzir os gastos energéticos e a vulnerabilidade da predação (SHINE, 1979).

Esse incremento da atividade diferenciado entre machos e fêmeas observado em serpentes na fase reprodutiva (ALDRIDGE; BROWN, 1995; DENARDO; TAYLOR, 2011; GIBBONS; SEMLITSCH, 1987; MARQUES, 1996; OLIVEIRA; MARTINS, 2001), pode ser interpretada como um efeito negativo, ou seja, um custo reprodutivo associado à sobrevivência. Os custos associados à sobrevivência são aqueles que interferem na probabilidade de sobrevivência de organismos reprodutivos (e na sua habilidade reprodutiva futura), já que durante esse período, os espécimes tornam-se mais ativos e conseqüentemente mais susceptíveis a predadores (ALDRIDGE; BROWN, 1995; HARTMAANN et al., 2002; SUEIRO et al., 2010), bem como à outros fatores limitantes de sua sobrevivência – como exigências metabólicas de alto investimento energético (AUBRET; BONNET; SHINE, 2002; BONNET; BRADSHAW; SHINE, 1998).

A abundância de espécimes de serpentes ao longo do ano vem sendo estudado como parâmetro para avaliar os padrões de atividade de diferentes espécies e a ocorrência de picos sazonais de atividade de serpentes é bem conhecida para espécies de regiões temperadas

(BONNET et al., 1998; DALRYMPLE et al., 1991; GIBBONS; SEMLITSCH, 1987; KLIMSTRA, 1956; WINNE, et al., 2005) e mais recentemente, os padrões de atividade estão sendo revelados no contexto da história natural das espécies de serpentes tropicais (GOMES; MARQUES, 2012; HARTMANN et al., 2002; TORELO-VIEIRA; ARAÚJO; BRÁZ, 2012).

A inferência direta do padrão de atividade das serpentes vem sendo realizada ao longo dos anos pela comparação mensal do número de indivíduos encontrados e monitorados na natureza (BEAUPRE; DUVALL, 1998; DALRYMPLE, 1991; GLAUDAS; RODRIGUEZ-ROBLES, 2011; MARQUES, 1996; OLIVEIRA; MARTINS, 2001), pela avaliação de espécimes tombados em coleções zoológicas (BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; HARTMANN et al., 2002) e indiretamente pela variação das taxas de atropelamentos de serpentes nas rodovias (ALDRIDGE; BROWN, 1995; SCHUETT et al., 2002; SHINE et al., 2004), além de avaliação dos registros de recebimento de serpentes do Instituto Butantan, os quais contam com uma variação temporal de dados acumulados há mais de cem anos (MARQUES et al., 2001, MARQUES et al., 2009; SALOMÃO et al., 1995), bem como pela avaliação dos registros de acidentes ofídicos atendidos no Hospital Vital Brazil, (ALMEIDA-SANTOS, 2005; MEDEIROS et al., 2010), e por outras instituições médicas que atendem pacientes picados por serpentes (OLIVEIRA; MARTINS, 2001).

Dessa forma, a elucidação dos custos reprodutivos associados à sobrevivência pode ser realizada por meio de levantamentos das taxas de atividade que podem refletir a taxa de mortalidade entre machos e fêmeas, ocasionadas por predadores naturais, atropelamento ou avistamento por humanos ou mesmo do levantamento de dados epidemiológicas ao longo das variações dos eventos reprodutivos das espécies (ALDRIDGE; BROWN, 1995; BONNET; NAULLEAU; SHINE, 1999; GLAUDAS; RODRIGUES-ROBLES, 2011).

Sabe-se que inúmeros são os fatores que atuam de forma integrada na variação sazonal da atividade das serpentes, os quais estão relacionados desde ao esforço da coleta, até aos fatores relacionados à dinâmica do habitat das espécies (BEAUPRE; DUVAL, 1998; GIBBONS; SEMLITSCH, 1987).

Entretanto, estudos que abordam a influência das estratégias reprodutivas nos padrões de atividades de serpentes neotropicais ainda são incipientes e, idealmente precisamos de informações mais específicas entre machos e fêmeas para elucidar o quão influente é o sistema de acasalamento para a determinação dos padrões de atividade. Assim, para inferirmos a resposta da pergunta proposta neste presente trabalho: A sazonalidade reprodutiva de *Crotalus durissus* (Serpentes, Viperidae) impõe um custo reprodutivo diferenciado entre machos e fêmeas? é necessário investigar parâmetros comportamentais e

fisiológicos fundamentais para a melhor compreensão dos custos reprodutivos de serpentes neotropicais (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; BONNET, 2011; MATHIES, 2010).

Dessa forma, a proposta desse trabalho é avaliar os custos reprodutivos associados à sobrevivência entre machos e fêmeas de *Crotalus durissus* do Estado de São Paulo, por meio da avaliação sazonal dos dados de entrada de serpentes (=atividade) do Instituto Butantan e dos registros de acidentes crotálicos do Hospital Vital Brazil.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Dados da recepção de serpentes do Instituto Butantan

As *Crotalus durissus* entregues por fornecedores à Recepção de Serpentes do Instituto Butantan foram observadas pelos funcionários quanto ao dimorfismo sexual da cauda (KING et al., 2006) para a determinação do sexo, durante os anos de 2007 e 2008. O número de espécimes recebidos durante as estações foram contabilizados para análise da atividade diferenciada entre machos e fêmeas em relação ao ciclo reprodutivo da espécie. Infelizmente, durante o ano de 2009 o procedimento de sexagem das cascavéis foi abolido.

Para a inferência da abundância sazonal de *Crotalus durissus*, os livros de registros de recepção de espécimes também foram avaliados ao longo dos anos de 2007, 2008 e 2009. Tais registros não especificam o sexo dos indivíduos, portanto, esse conjunto de dados foi utilizado para averiguação da atividade sazonal da referida espécie.

2.2.2 Dados dos registros de acidentes crotálicos atendidos no hospital Vital Brazil

Os livros de registros dos acidentes causados por *Crotalus durissus* atendidos no Hospital Vital Brazil, no período de 1959 a 2012 foram avaliados para obtenção da data do acidente e análise sazonal dos acidentes crotálicos.

Os animais trazidos pelos pacientes são processados e tombados na Coleção Vital Brazil. Os espécimes que apresentavam condições de dissecação foram avaliados quanto ao status reprodutivo – para os machos observou-se o aspecto do ducto deferente como parâmetro para inferir a presença de espermatozoides, indicativo de maturidade sexual e para as fêmeas observou-se a presença de embriões no oviduto, folículos vitelogênicos (maior que 10mm) e oviduto preguiado como indicativos de atividade reprodutiva (ALMEIDA-SANTOS, 2005; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012).

2.2.3 Dados climáticos

Com a finalidade de avaliar a variação sazonal dos parâmetros climáticos e relacioná-los com as variações das estratégias reprodutivas entre machos e fêmeas, dados de temperatura e umidade relativa do ar foram levantados junto à estação metrológica do IAG - Instituto de Astronomia e Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo.

2.2.4 Análises estatísticas

Padrão de atividade sazonal

Para a análise da variação sazonal das médias dos dados oriundos da Recepção de Serpentes do Instituto Butantan nos anos de 2007, 2008 e 2009 referentes à *Crotalus durissus* do Estado de São Paulo, testes de normalidade e homogeneidade de variância foram aplicados para verificar os requerimentos de uma análise paramétrica. Os resultados das médias foram comparados utilizando-se o teste de Análise de Variância (one-way ANOVA) seguido do teste Tukey ($p < 0.05$).

Padrão de atividade sazonal entre machos e fêmeas

Consideramos a hipótese de que o padrão de atividade entre machos e fêmeas de *C. durissus* não é igual em decorrência da influência do repertório reprodutivo diferenciado entre os gêneros.

E para podermos inferir esta divergência sazonal da atividade entre os gêneros, é necessário comparar proporções, isto é, as possíveis divergências entre as frequências observadas e esperadas do número de indivíduos ao longo das estações. Para tanto, o teste χ^2 *qui quadrado* ($p < 0.05$) foi aplicado entre machos e fêmeas ao longo dos meses dos anos de 2007 e 2008.

Padrão sazonal dos acidentes crotálicos (Hospital e coleção Vital Brazil)

Semelhante à hipótese do padrão de atividade entre machos e fêmeas, os acidentes crotálicos, também apresentam uma diferenciação sazonal quanto à proporção do número de acidentes ao longo dos meses. Para testar essa hipótese, o teste χ^2 *qui quadrado* ($p < 0.05$) foi aplicado entre as proporções do número de acidentes no período compreendido entre 1959 e 2012 e do número total de acidentes causados por machos e fêmeas.

As análises foram realizadas a partir do programa BioStat 5.0 e o critério de significância adotado foi de $p < 0.05$.

2.3 Resultados

2.3.1 Dados climáticos

As médias máximas e mínimas da temperatura e umidade dos anos de 2007, 2008 e 2009 estão apresentadas na Tabela 4. Observa-se que as menores temperaturas estão concentradas no inverno dos três anos avaliados. A menor temperatura foi de 3.3 °C em julho e 4.1 °C em junho ambas durante ano de 2007, perfazendo uma média de 5.6 °C no inverno do referido ano. Como esperado, as maiores médias de temperaturas foram registradas ao longo do verão e da primavera para todos os anos com máxima de 34.2 °C durante a primavera e 33.5 °C para o verão.

Para umidade relativa do ar, os menores valores foram registrados ao longo do inverno de todos os anos – com valor mínimo de 49.3% no ano de 2007. Maiores médias de umidade foram registradas ao longo das quatro estações, com pequenos valores de variações entre as médias.

Tabela 4 - Variação das médias das temperaturas máximas e mínimas e da umidade relativa do ar máxima e mínima ao longo das estações dos anos de 2007, 2008 e 2009.

Estação	T°C (Média±Desvio Padrão)		Umidade Relativa (%) (Média±Desvio Padrão)	
	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima
	2007			
Verão	33.5±1.6	13.7±2.1	94.2±0.6	57.4±6.1
Outono	31.6±1.7	11.1±5.0	94.7±0.2	53.9±8.2
Inverno	29.5±2.1	5.6±3.3	93.9±0.6	49.3±1
Primavera	34.2±1	10.4±0.6	93.3±4.2	53±7.8
	2008			
Verão	26.8±0.9	17.1±0.9	94.4±0.7	59.3±2.9
Outono	25±2.3	15.2±2.6	93.9±1.2	56.6±3.4
Inverno	23.3±1.1	11.8±1.5	94.7±0.9	50±9.7
Primavera	24.6±1.4	14.8±1.7	94.6±0.6	58.1±2.5
	2009			
Verão	27.7±0.9	18.4±0.5	95.2±0.1	59.5±3.1
Outono	25.9±2	16±2.3	94.9±0.2	57.8±1.5
Inverno	21.6±1.9	11.6±1.2	95.3±1.3	95.2±0.2
Primavera	25.9±2	16.7±2.2	57.8±8.6	62.6±5.6

2.3.2 Padrão de atividade sazonal

Durante os anos de 2007, 2008 e 2009, um total de 3.684 espécimes de *Crotalus durissus* adultos foi recebido pelo Instituto Butantan com média anual de 1.228 indivíduos.

A variação sazonal de recebimento das cascavéis revelou um pico durante o outono para todos os anos (Figuras.27, 28 e 29). A média do número de indivíduos recebidos entre as estações dos anos de 2007 a 2009 está representada na Figura 30. Para o verão a média foi de $321,66 \pm 118,49$; $461,66 \pm 98,43$ para o outono, $203,33 \pm 71,59$ para o inverno e durante a primavera a média foi de $241,33 \pm 56,04$ indivíduos. O teste ANOVA (um critério) e o teste Tukey revelaram uma diferença significativa entre as médias do inverno e do outono ($p < 0.05$; $Q = 5.00$). Entre as demais estações do ano, não foram encontradas diferenças significativas entre as médias ($F = 4,89$; $p = 0.03$).

Figura 27 -Variação sazonal do número de espécimes de *Crotalus durissus* do Estado de São Paulo recebidos pelo Instituto Butantan em 2007.

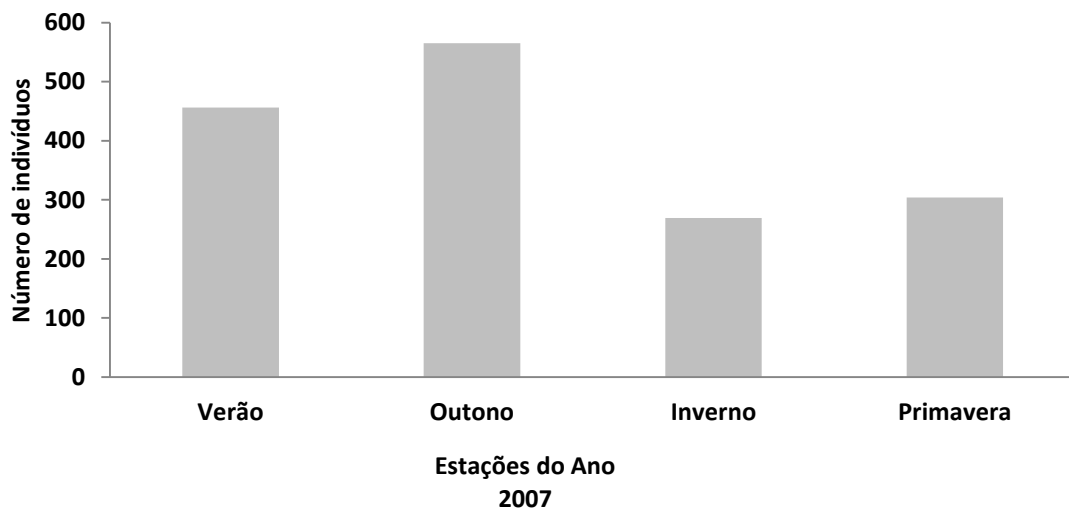


Figura 28 - Variação sazonal do número de espécimes de *Crotalus durissus* do Estado de São Paulo recebidos pelo Instituto Butantan em 2008.

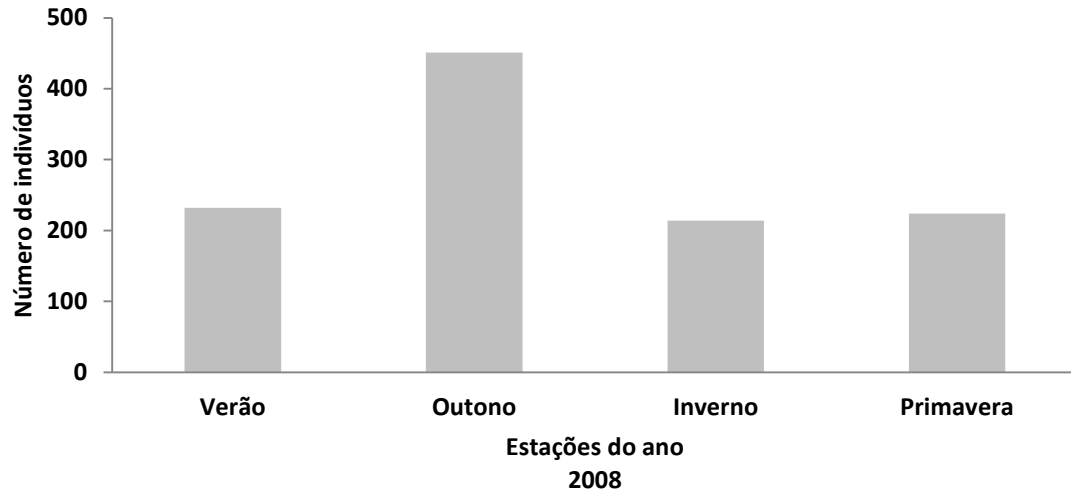


Figura 29 - Variação sazonal do número de espécimes de *Crotalus durissus* do Estado de São Paulo recebidos pelo Instituto Butantan em 2009.

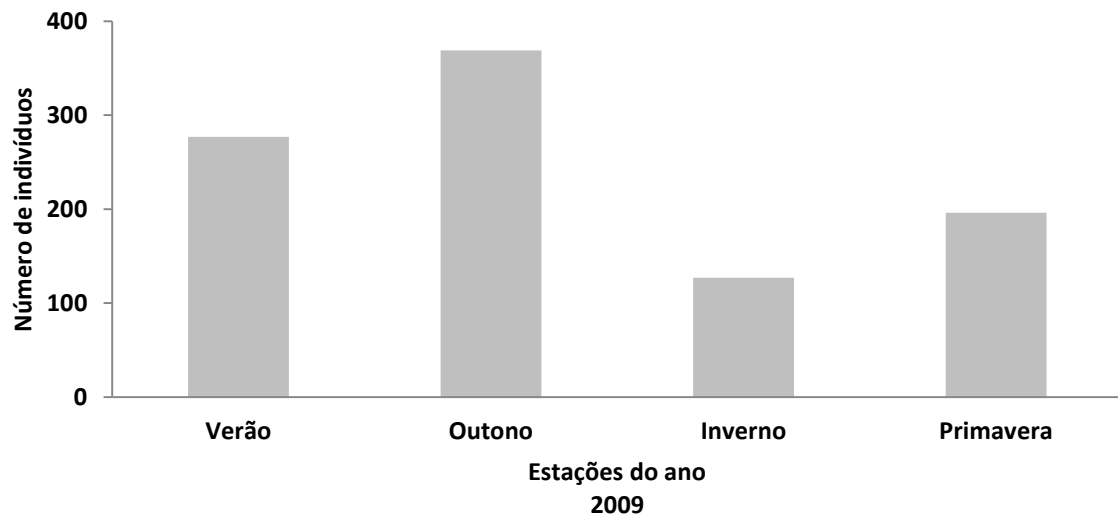
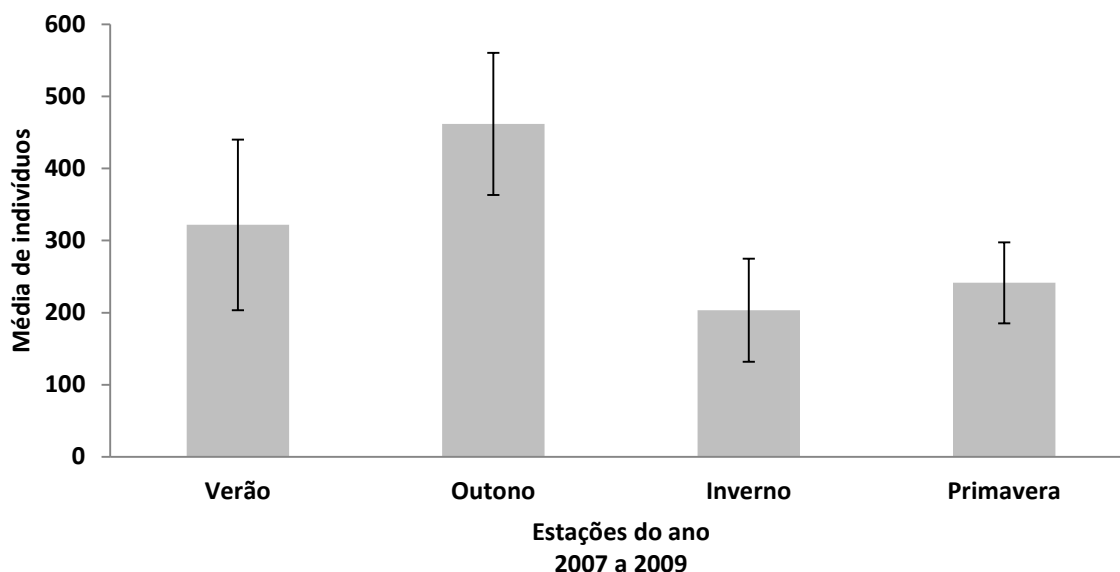


Figura 30 – Variação sazonal da média de indivíduos de *C. durissus* recebidos pelo Instituto Butantan.



Legenda - Período compreendido entre 2007, 2008 e 2009. As linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão dos valores.

2.3.3 Padrão de atividade entre machos e fêmeas

Um total de 1.487 espécimes de *C. durissus* adultos foi recebido pelo Instituto Butantan, sendo 792 machos e 695 fêmeas durante os anos de 2007 e 2008. A média do número de machos durante os anos de 2007 e 2008 foi de 396 ± 12.72 , para o número de fêmeas foi de 347 ± 0.7 . Para o número de machos ($n=387$) e fêmeas ($n=347$) recepcionados durante o ano de 2007 e entre machos ($n=405$) e fêmeas ($n=348$) no ano de 2008 não foram encontradas variações significativas entre as proporções $\chi^2 = 2.18$; $gl=1$; $p=0.15$ e $\chi^2 = 0.11$; $gl=1$; $p=0.7$ respectivamente (Figura 31). O mesmo padrão também foi revelado no total de machos e fêmeas ao longo dos dois anos $\chi^2 = 1.56$; $gl=1$; $p=0.22$ (Figura 32).

Entretanto, quando as proporções entre machos e fêmeas foram comparadas mês a mês, foi observado um pico de atividade de machos durante o outono nos dois anos de levantamento de recepção de cascavéis do Instituto Butantan (Figuras 33 e 34). O teste χ^2 revelou significância para a variação mensal entre as proporções de machos ($\chi^2 = 190$; $gl=11$; $p=0.0001$) com um pico acentuado em maio ($n=68$) de 2007 e em abril ($n=93$) de 2008 ($\chi^2 = 107,98$; $gl=11$; $p=0.0001$). Para as fêmeas foi encontrada uma maior atividade entre agosto e novembro (pico em outubro, $n=41$) durante o ano de 2007 ($\chi^2 = 37.24$; $gl=11$; $p=0.0001$) e entre agosto e dezembro com pico de atividade em outubro, ($n=36$) em 2008 ($\chi^2 = 27.51$; $gl=11$; $p=0.0038$).

A avaliação sazonal da proporção total de machos e fêmeas nos dois anos (Figura 35) revelou uma diferença significativa entre machos e fêmeas com maior número de machos ao longo do verão (n=255) e outono (n=316) $\chi^2 = 187,34$; gl=3; p=0.0001 e mais fêmeas ao longo do inverno (n=156) e da primavera (n=167) $\chi^2 = 36.50$; gl=3; p=0.0001.

Figura 31 – Variação do número de machos e fêmeas de *C. durissus* recepcionados pelo Instituto Butantan entre os anos de 2007 e 2008.

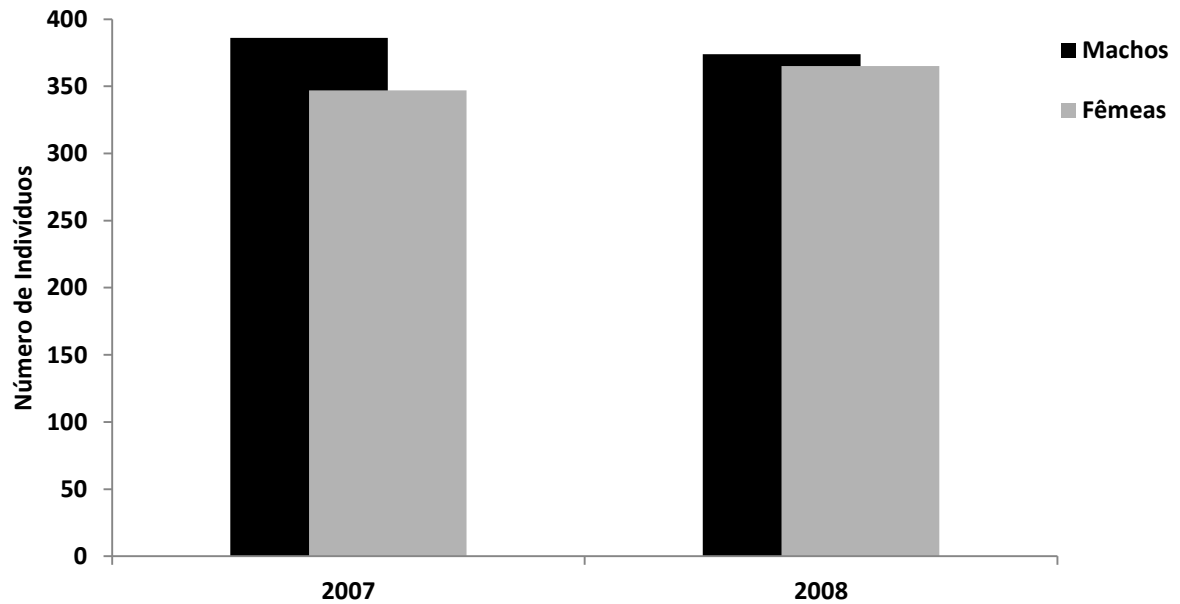


Figura 32 – Variação do número de machos e fêmeas de *C. durissus* recepcionados pelo Instituto Butantan entre os anos de 2007 e 2008.

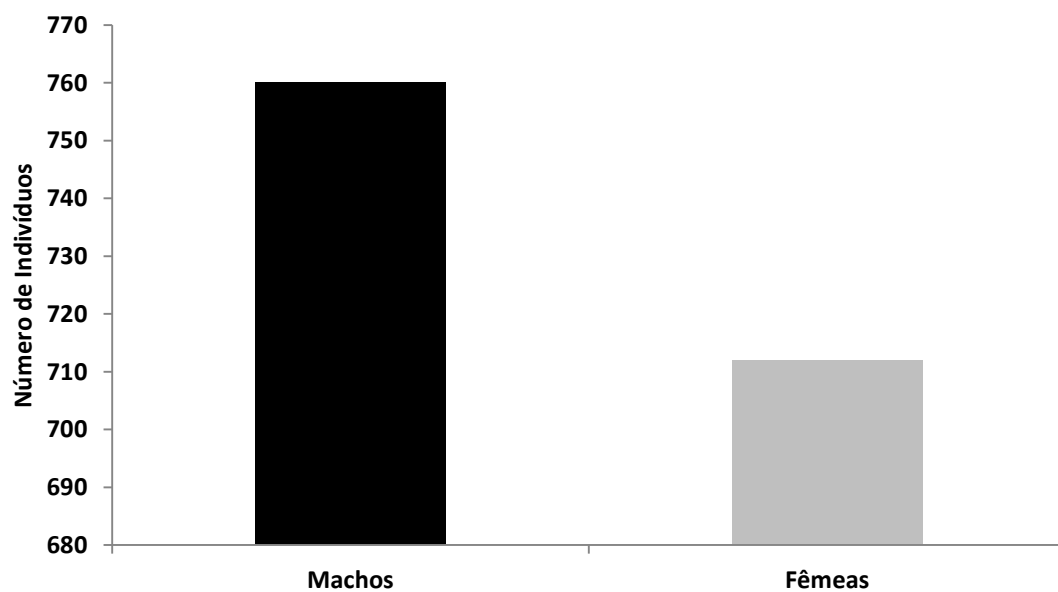


Figura 33 – Variação da proporção total de machos e fêmeas de *C. durissus* recepcionados pelo Instituto Butantan nos anos de 2007 e variação mensal das temperaturas máximas e mínimas.

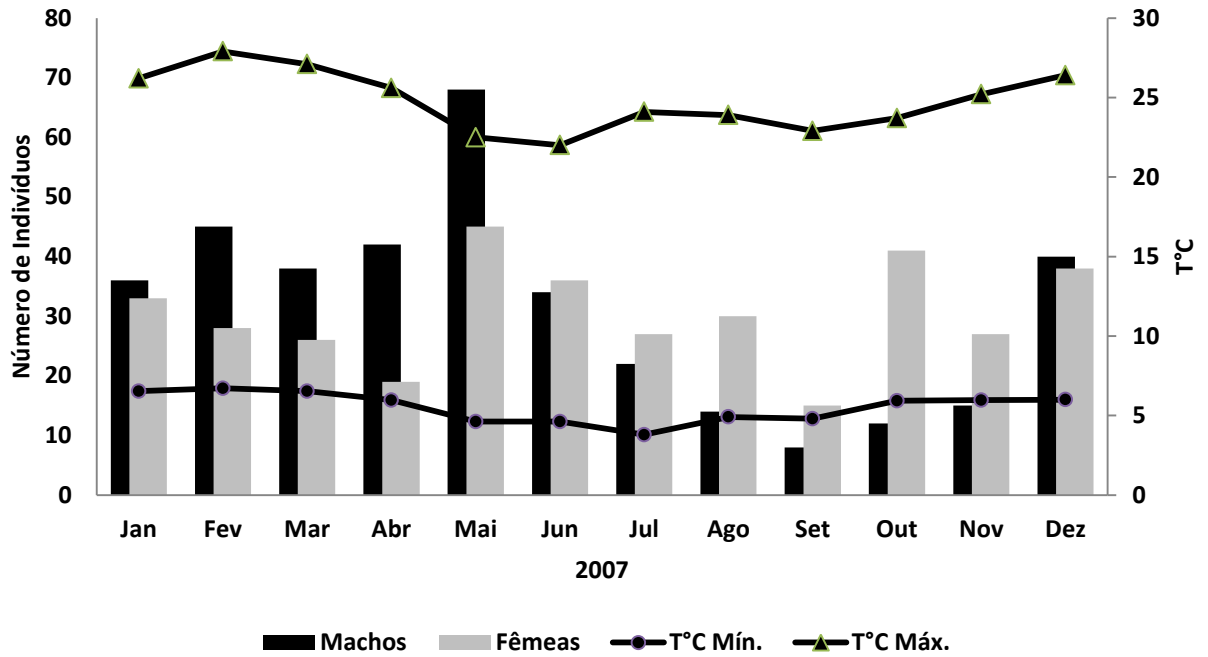


Figura 34 - Variação mensal do número de machos e fêmeas de *C. durissus* recepcionados pelo Instituto Butantan no ano de 2008 e variação mensal das temperaturas máximas e mínimas.

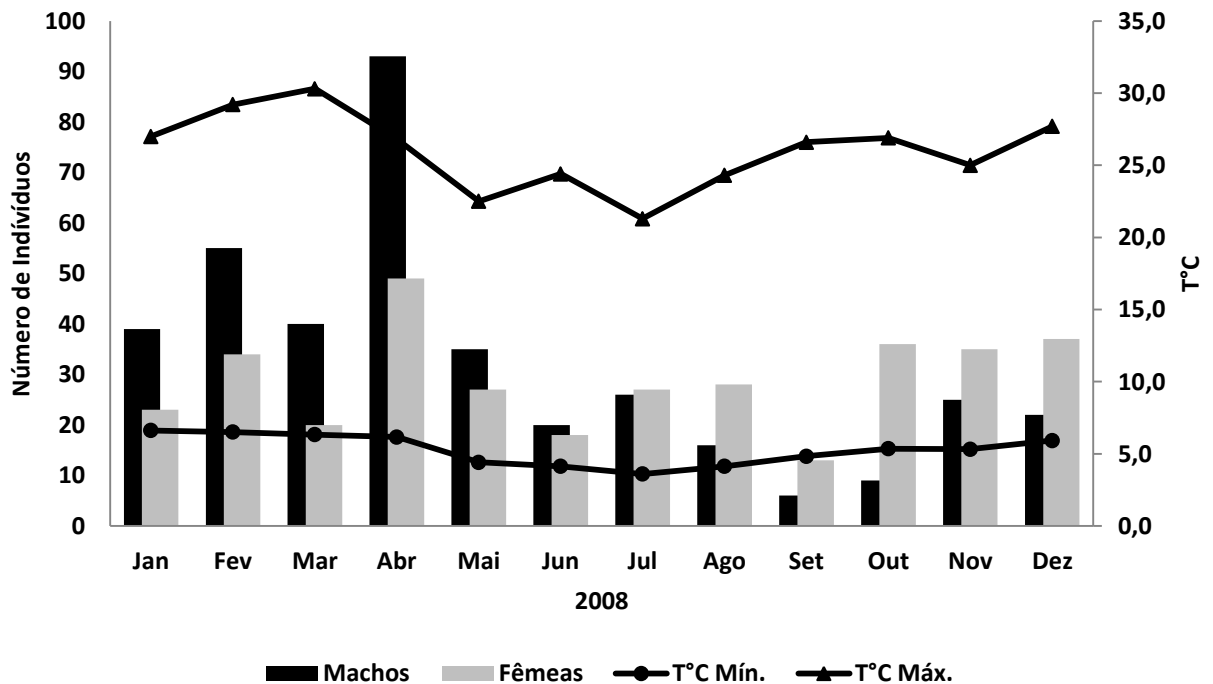
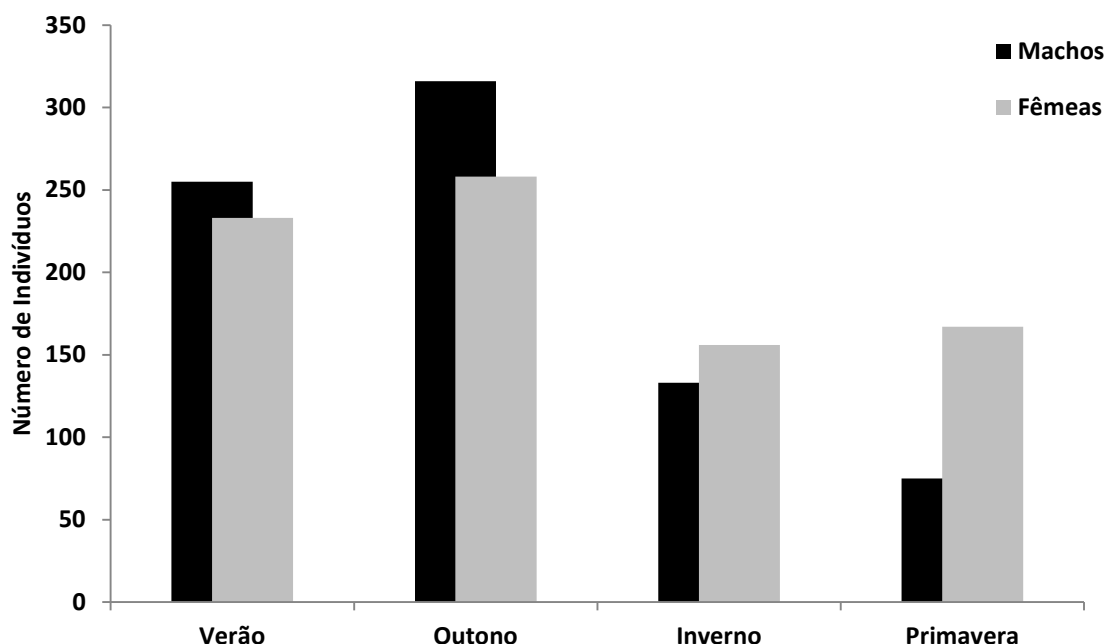


Figura 35 – Variação sazonal do número total de machos e fêmeas de *C. durissus* recepcionados pelo Instituto Butantan no ano de 2008 e 2007.



2.3.4 Sazonalidade dos acidentes crotálicos atendidos no Hospital Vital Brazil

Em decorrência da falta de registro do sexo do animal causador do acidente crotálico, a diferenciação da proporção de acidentes entre machos e fêmeas não foi possível ser detectada. Entretanto, com os dados de dissecação dos espécimes tombados na coleção Vital Brazil, uma parcela dos acidentes foi avaliada quanto ao sexo do animal. O número de acidentes registrados ao longo do verão foi 62; para o outono 77, durante o inverno o número de acidentes foi de 30 e para a primavera o número de acidentes foi de 47. O teste χ^2 revelou um pico de acidentes crotálicos entre março (n=30) e abril (n=28) $\chi^2 = 34.66$; gl=11; p=0.0003 (Figura 36). Congruente com esse resultado, a avaliação sazonal dos registros dos acidentes crotálicos mostrou um incremento de acidentes para o verão (n=62) e o outono (n=77) $\chi^2 = 22.53$; gl=3; p=0.0001.

A comparação da proporção de indivíduos machos (n=30) e fêmeas (n=23) de *C. durissus* tombados na coleção Vital Brazil e que foram submetidos à dissecação (Figura 37) não revelou diferença significativa ($\chi^2 = 0.95$; gl=1; p=0.40). Entretanto, ao avaliar a proporção entre machos reprodutivos (sexualmente maduros) e não reprodutivos (sexualmente imaturos), observou-se uma diferença acentuada, com machos reprodutivos (n=27) causando mais acidentes que os machos não reprodutivos (n=3) $\chi^2 = 19.20$; gl=1; p=0.0001. Para as

fêmeas a proporção entre reprodutivas e não reprodutivas foi a mesma, 11 fêmeas apresentaram características de atividade reprodutiva e 11 fêmeas apresentaram característica de fase reprodutiva quiescente (Figura 38).

Figura 36 – Variação mensal do número de acidentes crotálicos atendidos no Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan no período de 1959 a 2012.

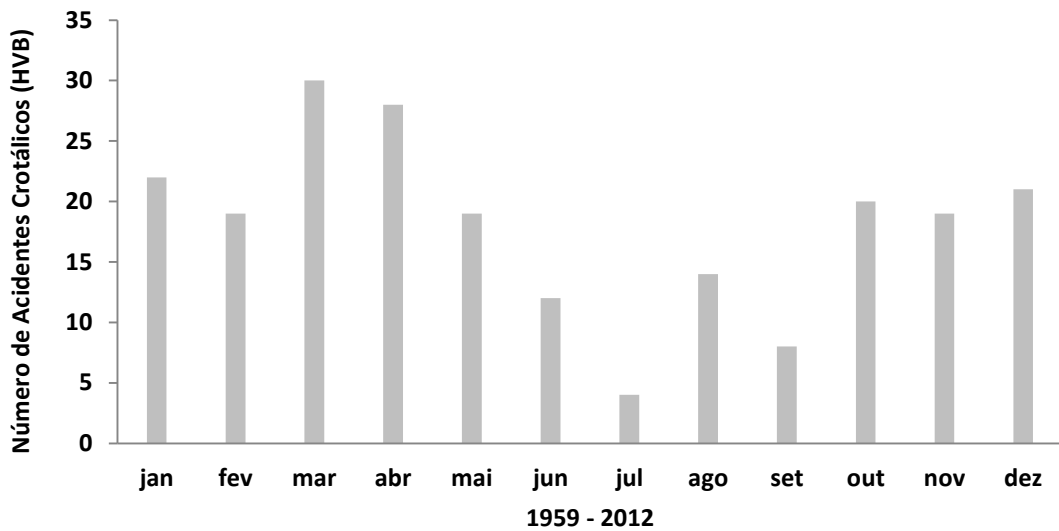


Figura 37 – Proporção entre machos e fêmeas de *C. durissus* dissecados da Coleção Vital Brazil.

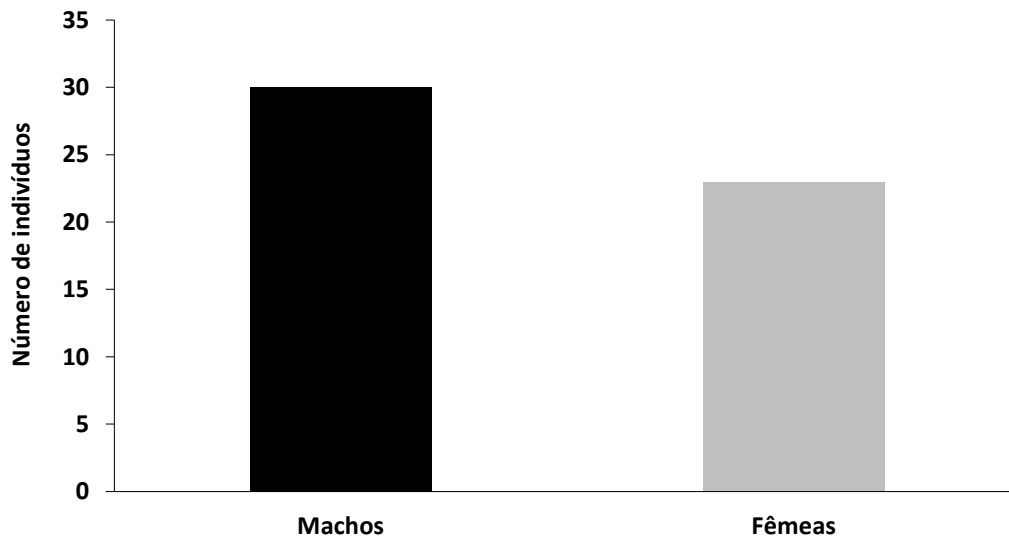


Figura 38 – Proporção entre machos e fêmeas reprodutivas e não reprodutivos de *C. durissus* dissecados da Coleção Vital Brazil.

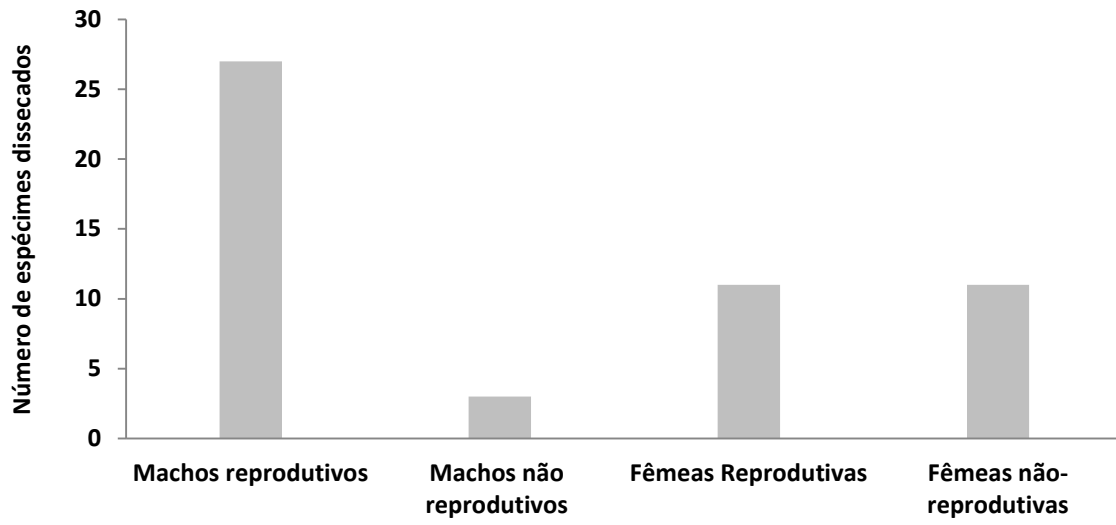
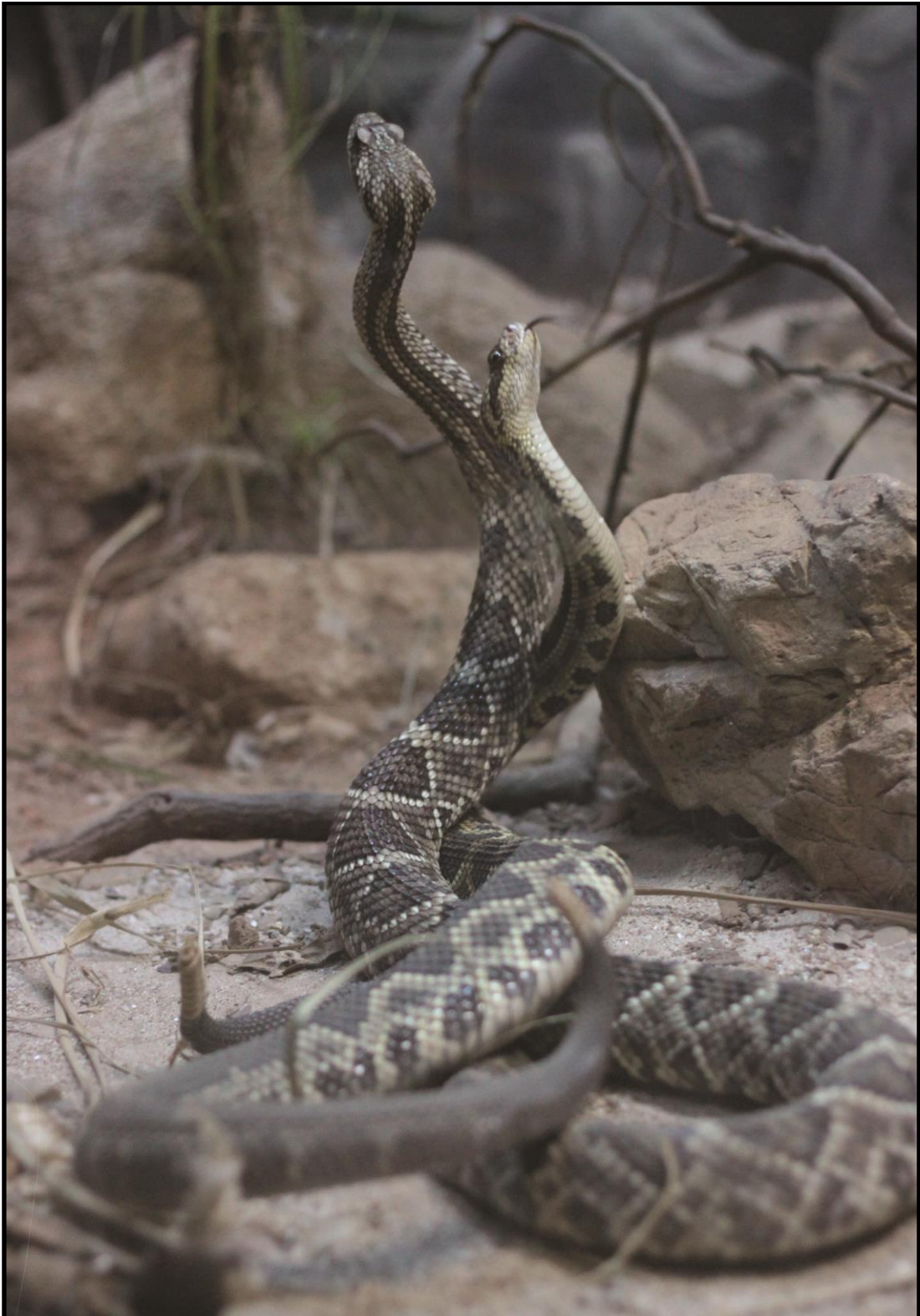


Figura 39 – Interações agonísticas entre dois machos de *Crotalus durissus* engajados num ritual de combate no Museu Biológico do Instituto Butantan, no fim do verão de 2012 (março).



Fonte: Pinheiro (2012)¹.

¹ PINHEIRO, T. M. São Paulo, 2012.

2.4 Discussão

Alguns autores atribuem à existência da reprodução sexuada como sendo a fonte primária dos custos envolvidos na reprodução, pois a meiose pode ser interpretada como uma estratégia que postula metade dos genes da fêmea na produção da prole, além da recombinação entre os genes dos machos e das fêmeas. Sugere-se ainda que a reprodução sexuada para organismos com baixa fecundidade é "desajustada" no sentido em que atribuiria uma desvantagem se comparada à partenogênese (DALY, 1978; WILLIAMS, 1975).

Os custos em questão surgem do fato de que a reprodução sexuada exige uma "orquestração" de quesitos fisiológicos e comportamentais entre dois organismos, enquanto a reprodução assexuada não requer associação com o sexo oposto e os interesses entre machos e fêmeas podem ser incompatíveis (MATHIES, 2011; TRIVERS, 1972).

Dentro do sistema de acasalamento de machos de serpentes, o repertório reprodutivo inclui os custos associados à espermatogênese, ao desenvolvimento de caracteres sexuais secundários (segmento sexual renal), aos comportamentos específicos durante a estação reprodutiva como busca prolongada por fêmeas e rituais de combate, à cópula e guarda da cópula (ALDRIDGE; DUVALL, 2002, MATHIES, 2010, MATHIES, 2011).

Embora haja um custo energético associado à preparação para reprodução para ambos os sexos, os custos comportamentais que incrementam as taxas de atividade recaem principalmente sobre os machos, sobretudo pelo repertório comportamental exercido na estação de acasalamento (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; DALY, 1978). Vários trabalhos revelam uma considerável atenção às estratégias de acasalamento e às adaptações comportamentais e morfológicas em serpentes (ALDRIDGE; BROWN, 1995; GLAUDAS; RODRIGUEZ-ROBLES, 2011; MATHIES, 2010; SHINE; MASON, 2012) e geralmente revelam que machos incrementam as taxas de atividade e de movimentação ao longo da estação reprodutiva (KING; DUVALL, 1990; SECOR, 2002).

Em espécies que se reproduzem sexualmente, a aptidão sexual de um indivíduo pode ser melhorada pela habilidade de detectar rapidamente o status reprodutivo do sexo oposto (SHINE; MASON, 2012). Nesse quesito, os machos de serpentes são capazes de encontrar fêmeas receptivas utilizando pistas químicas (feromônios) assim como outros animais. Durante o processo vitelogênico, os lipídeos provenientes do estoque de corpos de gordura abdominal das fêmeas, são acumulados no fígado e consumidos durante o ciclo dos folículos ovariano. Essa transformação de gordura em vitelo é mediada pela vitelogenina (proteína precursora do vitelo) e a deposição de vitelo nos folículos ocorre via corrente sanguínea

(SHERIDAN, 1994). Assim, a vitelogenina é a pista química reconhecida pelos machos, para identificar uma fêmea receptiva, pois atua na sinalização do estro, quando as fêmeas liberam partículas desse feromônio no ar para atrair parceiros na época da cópula (ANDERSON, 1994; SHINE; MASON, 2012).

Dada a sazonalidade marcante relatada para o período de cópula e para as modificações fisiológicas descritas entre as *Crotalus* neotropicais (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; ALMEIDA-SANTOS, 2005; BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012; PUORTO et al., 1995) e de regiões temperadas (ALDRIDGE; BROWN, 1995; BEAUPRE; DUVALL, 1998; GREGORY; MACARTNEY; LARSEN, 1987), os dados aqui apresentados corroboram a hipótese de que os machos de que adotam um sistema de acasalamento poligâmico que inclui a busca prolongada por fêmeas receptivas, elevam a taxa de atividade durante a estação reprodutiva, tornando-os mais susceptíveis à mortalidade (BONNET; NAULLEAU; SHINE, 1999).

Para as três metodologias de inferência de padrão de atividade – padrão sazonal geral, padrão sazonal diferenciado entre machos e fêmeas (recepção de serpentes do Instituto Butantan) e avaliação sazonal dos acidentes crotálicos, todas mostraram um evidente incremento no número de indivíduos durante o verão e outono e uma atividade diferenciada entre machos e fêmeas nessas estações, ratificando os dados de padrão de atividade para serpentes neotropicais e temperadas (ALMEIDA-SANTOS, 2005; MARQUES, RODRIGUES; ALMEIDA-SANTOS, 2006; PIZZATO; MARQUES, 2006).

Landreth, (1973) descreveu a distância percorrida de fêmeas de *Crotalus atrox*, durante o meio do verão, (período de cópulas) de 72,4 a 105,6 metros, sem forrageamento, fuga ou outro tipo de comportamento que justificasse tal deslocamento, sugerindo que a movimentação pode aumentar as partículas de vitelogenina dispersas no ar, auxiliando a comunicação sexual. Entretanto, tal comportamento é mais predominante em machos (ALDRIDGE; DUVALL, 2002).

Machos de serpentes não exibem cuidado parental, e como resultado, o sucesso reprodutivo está limitado ao acesso às fêmeas, e, para aumentar as chances de sucesso reprodutivo, os machos aumentam as taxas de movimentação para assim, aumentar as chances de encontrar uma fêmea receptiva (GLAUDAS; RODRIGUES-ROBLES, 2011; MADSEN et al., 1993; RIVAS; BURGHARTD, 2005). Para *Vipera berus* o sucesso da cópula (número de cópula por machos) aumenta com a distância percorrida pelos machos, logo a taxa de movimentação dos machos durante o período reprodutivo aumenta em relação ao período não reprodutivo (BEAUPRE; DUVALL; 1998; PRESTT, 1971; SECOR, 2002).

Estudos de monitoramento em campo cascavéis norte americana- *Crotalus viridis viridis* demonstram que, embora machos e fêmeas estejam engajados no forrageamento na primeira metade do verão, apenas os machos continuam ativos na procura por fêmeas na segunda metade da estação – quando ocorre a época de acasalamento. Assim sendo, a cada temporada, machos exibem dois picos de atividade, na procura de alimento e na busca de parceiras para cópula, enquanto as fêmeas aumentam sua atividade apenas para o forrageamento. Além disso, observou-se também que durante as atividades de forrageamento, os machos são mais eficientes no encontro de presas, presumindo que, durante a estação de acasalamento os machos podem concentrar-se apenas na busca por fêmeas, evidenciando assim o sistema poligâmico com busca prolongada pelas fêmeas (ALDRIDGE; DUVAL 2002; DENARDO; TAYLOR, 2011; DUVALL et al., 1992; KING; DUVALL, 1990; SCHUETT, 1992).

O notório incremento de atividade ao longo do outono pode ser diretamente relacionado à maior movimentação de machos em busca de fêmeas e também ao engajamento em rituais de combate com outros machos concorrentes, como relatado para as *Crotalus* americanas (HERSEK; OWINGS; DAVID, 1992) e para as *Crotalus* neotropicais (ALMEIDA-SANTOS et al., 1998; SALOMÃO et al., 1995). Entre os rituais de combate descritos na literatura, os mais espetaculares estão entre os representantes da família Viperidae, em que os combatentes erguem-se até metade do seu corpo acima do solo (Figura 39) (ALMEIDA-SANTOS et al., 1998; ANDREN, 1986; CARPENTER, 1977).

A função de participar dessas lutas tem sido uma questão de debate, mas os dados favorecem a hipótese de que os machos estão envolvidos em competição por fêmeas (BOGERT; ROTH, 1966; GILLINGHAM et al., 1983; KLAUBER, 1972). Outras hipóteses incluem competição por alimentos, defesa territorial, estabelecimento de dominância (combates predatórios) e até mesmo à rejeição à corte homossexual entre machos (ALMEIDA-SANTOS et al., 1998; CARPENTER; GILLINGHAM, 1975; SHAW, 1951). Tal comportamento agonístico ocorre em vida livre, como observado para *Crotalus viridis oreganus* (HERSEK, OWINGS; DAVID, 1992) e também em condições cativas, tanto em cativeiro intensivo quanto semiextensivo (ALMEIDA-SANTOS et al., 1999; GILLINGHAM et al., 1983; PIZZATO; MAFIO; ALMEIDA-SANTOS, 2006). Em *Crotalus durissus cascavella*, observa-se rituais de combate no outono (maio), quando também foi observado um pico de espermatogênese e pico de atividade entre os machos (BARROS; SUEIRO; ALMEIDA-SANTOS, 2012).

Para as cascavéis oriundas do Estado de São Paulo, foi relatado além do combate, disputa por itens alimentares entre machos que apresentavam comportamento hierarquizado em recinto semiextensivo. Entretanto, o combate predatório por disputa de fêmeas receptivas sexualmente, foram registrados apenas no outono, enquanto a disputa por itens alimentares ocorreu também durante o inverno e a primavera (ALMEIDA-SANTOS et al., 1998). Essa variação na época de ocorrência de disputas por alimento também foi relatado para *Vipera berus* e *Vipera aspis*, (KELLEWAY, 1982; NAULLEAU, 1967) sugerindo, portanto, que os rituais de combate são consequência de uma seleção intersexual restrita à estação reprodutiva em viperídeos em que os machos competem pelo acesso às fêmeas (ALDRIDGE; DUVALL; 2002), revelando assim, um custo reprodutivo comportamental refletido pelo aumento da atividade durante o período reprodutivo.

Mesmo espécies de hábitos semifossoriais exibem um padrão de atividade moldado pelas estratégias reprodutivas. Duas linhagens filogenéticas do gênero *Micrurus*, diagnosticadas pelo padrão dos anéis pretos em mônades ou tríades, exibem diferentes estratégias reprodutivas. No clado tríade, a estação reprodutiva e o comportamento de combate por disputa intersexual, ocorrem durante o outono - estação na qual se observa o pico de atividade entre os machos. Já na linhagem mônade, não há relatos de rituais de combate, e o período de acasalamento está restrito a um curto período de vitelogênese durante a primavera, que pode explicar o pico de atividade dos machos nessa estação (MARQUES; PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS, 2013).

Alterações comportamentais associadas à época reprodutiva são acompanhadas de alterações neuroendócrinas do eixo hipotálamo-gonadal, que controlam a produção de hormônios sexuais e feromônios associados ao metabolismo das gônadas (espermatogênese e vitelogênese) e à atividade dos caracteres sexuais secundários (segmento sexual renal - SSR). Os feromônios são os estímulos químicos liberados no ar por indivíduos sexualmente ativos responsáveis pela orquestração de comportamentos sociais como busca e disputa intersexual por fêmeas que sinalizam a receptividade sexual com a liberação da vitelogenina (MASON; PARQUER, 2010; PARKER; MASON, 2011). Os dados apresentados no Capítulo 1 revelam um pico de atividade do segmento sexual renal (SSR) durante os meses do outono – apresentando maior número e densidade de grânulos secretores, hipertrofia do epitélio e uma diminuição do lúmen, indicativos de intensa atividade metabólica de hormônios esteroides como a testosterona, já que o SSR é andrógeno dependente o que permite a associação direta com a época do acasalamento (KROMER, 2004; ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2012; SHUETT, 2002).

Além do notório aumento de atividade de machos ao longo do outono, observa-se também durante o verão, um maior número de machos, o que pode ser explicada pela atividade de forrageamento para angariar reservas energéticas que serão necessárias para suprir a demanda dos gastos durante a estação reprodutiva seguinte, tais como: busca ativa e prolongada por fêmeas, competição intersexual e secreção dos grânulos do epitélio do SSR. Tal fato é corroborado pela elevada quantidade de gordura abdominal encontrada em machos de *Crotalus durissus* durante o verão (cf. Capítulo 1).

Podemos atribuir também à influência do pico espermatogênico das cascavéis durante o verão, o acréscimo das taxas de atividade e movimentação dos machos em relação às fêmeas (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004), já que para estarem aptos a praticarem múltiplas cópulas, há necessidade de produzir e estocar espermatozoides além de mantê-los viáveis até o outono. À esses requerimentos, atribui-se um custo energético elevado para a produção de espermatozoides, expresso pela perda significativa de massa corpórea durante a espermatogênese, semelhante ao gasto energético durante o empenho nos comportamentos reprodutivos como descrito em *Vipera berus* (OLSSON; MADSEN; SHINE, 1997).

Os dados referentes aos acidentes crotálicos, embora tenham revelado um número de acidentes muito próximo entre o verão e o outono, mostram que a maioria dos acidentes registrados é causada por machos sexualmente maduros como demonstrado por Salomão, Puerto e Almeida-Santos (1995) e por Almeida-Santos (2005). Ressalta-se ainda, que outros fatores influenciam diretamente o número de acidentes ofídicos – como maior atividade agrícola e maior número de pessoas em regiões rurais durante o verão (BOCHNER; STRUCHINER, 2003). Entretanto, os resultados obtidos reforçam o pressuposto de que os comportamentos reprodutivos exercidos ao longo do outono influenciam o perfil epidemiológico dos acidentes crotálicos, uma vez que mais machos maduros sexualmente são encontrados na coleção Vital Brazil. Para *Bothrops atrox*, a maior incidência de acidentes ofídicos se dá no final do verão, início do outono (março) coincidindo com o pico de atividade da espécie, porém os autores atribuem aos fatores climáticos – temperatura e precipitação como reguladores do padrão de atividade da referida espécie (OLIVEIRA; MARTINS, 2001)

A temperatura é um dos principais fatores que pode afetar criticamente a bioenergética e o padrão de atividade das espécies, e, assim, ter consequências para os múltiplos aspectos da ecologia de populações, incluindo o recrutamento, atividade, sobrevivência e viabilidade da população (SHINE, 2003). Assim sendo, as menores taxas de atividade para as três metodologias averiguadas nesse trabalho foram registradas durante o inverno, pressupondo que os menores valores de temperatura e umidade são os fatores mais provavelmente

responsáveis pelo decréscimo de atividade durante o inverno, pois temperaturas mais baixas afetam diretamente a taxa metabólica das serpentes, levando-as a limitar os movimentos durante essa estação (LILYWHITE, 1987; MARQUES; ETEROVIC; ENDO, 2001; MAY et al., 1996).

Para os aspectos que tangem a reprodução de répteis, sabe-se que a temperatura é o fator primário na determinação da recrudescência testicular, pois o processo espermatogênico inicia-se em condições térmicas mais elevadas, como evidenciado em *Crotalus viridis* (ALDRIDGE, 1975) e *Arizona elegans* (ALDRIDGE, 1979). Essa associação pode explicar também a maior atividade de machos em relação às fêmeas durante o verão, já que é durante essa estação em que as maiores temperaturas são registradas e observa-se o pico de produção de espermatozoides (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; cf. Capítulo 1). Para as fêmeas, a temperatura está diretamente ligada à embriogênese, sendo relatado para várias espécies de lagartos e serpentes, que fêmeas prenhes permanecem mais tempo termorregulando, propiciando assim, maiores chances para o fenótipo da prole (CHIARAVIGLIO, 2006; MARINHO, 2012).

Em fêmeas prenhes de répteis, alterações no padrão de atividade podem levá-las a terem suas chances de sobrevivência diminuídas por manterem-se mais expostas. Tais fatores estão relacionados às mudanças comportamentais durante a embriogênese (SHINE, 2003). Fêmeas prenhes podem gastar mais tempo termorregulando do que fêmeas não grávidas, por pelo menos três motivos: (1) aumento da massa corpórea pode exigir maiores taxas de aquecimento; (2) fêmeas prenhes selecionam temperaturas maiores para acelerar o desenvolvimento embrionário; (3) fêmeas prenhes selecionam maiores temperaturas para compensar a perda da agilidade devido ao incremento de massa corpórea, além da redução da habilidade locomotora para o escape de predadores. (GARDNER-SANTANA; BEAUPRE, 2009; LANDRETH, 1973; SEIGEL et al., 1987; SHINE, 1980).

Entre os lagartos, o incremento da atividade durante a fase reprodutiva é controversa, pois há relatos de que fêmeas de *Lacerta vivípara* prenhes tornam-se mais crípticas, deslocando-se mais devagar mudando inclusive a tática de predação, e dessa forma, sendo menos capturadas (BAUWENS; THOEN, 1981). Entretanto, para lagartos Scincídeos, foi descrito que fêmeas prenhes passam mais tempo termorregulando que fêmeas não prenhes e machos, além de terem sua capacidade de escape diminuída, aumentando o risco de predação por estarem mais expostas (SHINE, 1980).

Para serpentes, sobretudo entre os viperídeos, há indícios que as transformações exigidas durante os processos de vitelogênese, prenhez e a fase pós-parturição embutem um

maior risco de mortalidade (BONNET, 2011; MACARTNEY; GREGORY, 1988). Estudos em campo com *Vipera aspis* demonstram que fêmeas reprodutivas estão mais frequentemente expostas ao sol, quando comparadas às fêmeas não reprodutivas, refletindo diferentes taxas de captura – sendo as fêmeas reprodutivas duas vezes mais avistadas e capturadas (BONNET; NAULLLEAU, 1996). Os dados aqui apresentados corroboram essa hipótese, pois significativamente um maior número de fêmeas é recebido no Instituto Butantan durante a primavera – estação na qual as fêmeas reprodutivas estão em processo vitelogênico para propiciar a ovulação, a fertilização e posteriormente o desenvolvimento embrionário (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002; ALMEIDA-SANTOS, 2005; SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2002). Fêmeas vitelogênicas e prenhes de *Crotalus durissus* mantidas em cativeiro semiextensivo (Serpentário de Visitação Pública do Instituto Butantan), mantiveram-se por mais tempo expostas ao sol – fora dos abrigos contidos no recinto (MARINHO, 2012).

Em contrapartida, fêmeas prenhes em *Crotalus horridus*, mantêm-se menos ativas, utilizando menor área de uso e se locomovendo duas vezes menos que as fêmeas não prenhes, sugerindo assim, que os ajustes fisiológicos para a manutenção da temperatura corpórea mais propícia para eventos reprodutivos, não necessariamente requerem um aumento da atividade, e sim a seleção de microhabitats específicos para a maior demanda termorregulatória durante a gestação (GARDNER-SANTANA; BEAUPRE, 2009).

Os benefícios de múltiplos acasalamentos são maiores para os machos do que para fêmeas, pois apenas os machos podem contribuir geneticamente em mais de uma ninhada a cada estação reprodutiva (GLAUDAS; RODRIGUES-ROBLES, 2011). Além disso, as fêmeas costumam investir mais energia na produção da prole do que os machos (DIKE; BEAUPRE, 2011; cf. Capítulo 1). Por estas razões, os comportamentos de busca por parceiras sexualmente ativas e interações agonísticas intersexuais, fomentam o pico de atividade para os machos de diversas espécies (KOKK; WONG, 2007).

Por outro lado, algumas espécies não exibem um pico de atividade associado aos eventos reprodutivos, como descrito para a cascavel anã, *Sistrurus miliaris barbouri* cujo padrão de atividade não difere entre as estações reprodutiva e não reprodutiva, porém há indícios de que a temperatura é o fator mais proeminente que modula os padrões de atividade dessa população (MAY et al., 1996). Em *Tantilla melanocephala*, tanto para fêmeas quanto para machos, não há variação na proporção de indivíduos ao longo do ano (MARQUES; PUORTO, 1998). O mesmo padrão ocorre em *Acrochordus arafurae*, machos e fêmeas não diferiram no padrão de dispersão ao longo dos quatro anos de estudo *in situ*, sugerindo que a

atividade está mais relacionada às variações do volume de água dos charcos em que a espécie vive do que o sistema de acasalamento (HOUSTON; SHINE, 1994).

Os dados disponibilizados neste trabalho e na literatura apontam para um elevado custo reprodutivo comportamental para os machos durante período de acasalamento em relação às fêmeas. Tal custo pode ser evidenciado pela frequência de atividade de *C. durissus* durante a estação reprodutiva para as três metodologias avaliadas. Este ônus da reprodução é uma consequência direta do repertório comportamental e fisiológico incorporados no sistema de acasalamento poligâmico adotado pelas *C. durissus* neotropicais, bem como para outras espécies de viperídeos com ampla distribuição. Por fim, os dados preconizados nesta discussão respondem positivamente a pergunta levantada no título.

3 CONCLUSÕES GERAIS

A reprodução é custosa para ambos os sexos, no entanto, os valores revelados por este trabalho sugerem que as fêmeas passam por processos reprodutivos mais dispendiosos energeticamente. Há uma mobilização dos substratos energéticos (gordura abdominal) para o fígado, o qual passa por alterações da massa e alterações histológicas que podem ser atribuídas ao processo vitelogênico. Essa mobilização ocorre na transição da vitelogênese primária para vitelogênese secundária, e posteriormente, dos folículos vitelogênicos para os embriões (APÊNDICE). Os índices lipossomático, hepatossomático e “renalssomático” mostraram-se estimadores precisos da mobilização dos substratos energéticos tanto para os machos como para as fêmeas, ao longo da estação reprodutiva, confirmando ser a extração lipídica uma ferramenta que pode ser utilizada para inferir a dinâmica de lipídeos nos diferentes tecidos de *C. durissus*.

Os machos estocam mais gordura abdominal durante o verão, estação que precede a cópula e outros eventos reprodutivos e é a estação na qual se observa o pico de espermatogênese. Além disso, a massa relativa dos rins e a concentração de lipídeos renais apresentaram significativamente maiores valores e a histologia do segmento sexual renal (SSR) apresentou um aumento visível da produção dos grânulos secretores no epitélio durante o outono, indicando dessa forma, que os comportamentos e as alterações fisiológicas associadas à reprodução em machos de *C. durissus* são energeticamente dispendiosos. Já nas fêmeas não foi detectado nenhuma região hipertrofiada dos rins, e a histologia renal não revelou variações ao longo do ano.

O padrão de atividade de machos de *C. durissus* é alterado em decorrência do repertório comportamental do sistema de acasalamento adotado, como procura prolongada por fêmeas e competição intraespecífica (rituais de combate), observadas no outono, levando-os a ficarem mais expostos e conseqüentemente mais avistados. E em consequência disso, machos maduros sexualmente causam mais acidentes crotálicos, observados durante o verão e o outono. Para fêmeas as variações do padrão de atividade provavelmente decorrem das alterações metabólicas e comportamentais observadas durante a vitelogênese secundária e da prenhez, já que uma maior proporção de fêmeas foi observada durante a primavera.

REFERÊNCIAS*

- ALDRIDGE, R. D. Seasonal spermatogenesis in sympatric *Crotalus viridis* and *Arizona elegans* in New Mexico. **Journal of Herpetology**, v. 13, n. 2, p. 187-192, 1979.
- ALDRIDGE, R. D. Environmental control of spermatogenesis in the rattlesnake *Crotalus viridis*. **Copeia**, v. 1, n. 3, p. 493-496, 1975.
- ALDRIDGE, R. D.; JELLEN, B. C.; SIEGEL, D. S.; WISNIEWSKI, S. S. The sexual segment of the kidney. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. (Ed.). **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Enfield: Science Publishers, 2011. p. 477-509.
- ALDRIDGE, R. D.; DUVAL, D. Evolution of the mating season in the pitvipers of North America. **Herpetological Monographs**, v. 16, p. 1-25, 2002.
- ALDRIDGE, R. D. Female reproductive cycles of the snakes *Arizona elegans* and *Crotalus viridis*. **Herpetologica**, v. 35, p. 256-261, 1979.
- ALDRIDGE, R. D.; BROWN, W. S. Male reproductive cycle, age at maturity, and cost of reproduction in the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*). **Journal of Herpetology**, v. 29, p. 399-407, 1995
- ALDRIDGE, R. D.; JELLEN, B. C.; SIEGEL, D. S.; WISNIEWSKI, S. S. Reproductive cycles of tropical snakes. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. (Ed.). **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Enfield: Science Publishers, 2011. p. 477-510.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M. ; M. ORSI. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): Morfologia e função do oviduto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 2, p. 109-112, 2002.
- ALMEIDA-SANTOS, S.M. ; SALOMÃO, M. G. Long-term sperm storage in the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). **Japanese Journal Herpetology**, v. 17, p. 46-52, 1997.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Reproductive strategies in tropical pitvipers, genus *Bothrops* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae). In: SCHUETT, G.; HÖGGREN, M.; GREENE, H. W. (Ed.). **Biology of the vipers**. Carmel, Indiana, USA: Biological Sciences Press, 2002. p. 445-462.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. 2005. 204 f. Tese (Doutorado em Anatomia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; LAPORTA-FERREIRA, I. L.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C. Sperm storage in males of the snake *Crotalus durissus terrificus* (Crotalinae: Viperidae) in southeastern Brazil. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 139, p. 169-174, 2004.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G.; PENETI, E. A.; SENA, P. S.; GUIMARÃES, E. S. Predatory combat and tail wresteling in hierarchical contexts of Neotropical Rattlesnakes *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes: Viperidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 20, p. 88-96, 1999.

AUBRET, F.; BONNET, X.; SHINE, R.; LOURDAIS, O. Fat is sexy for females but not males: The influence of body reserves on reproduction in snakes (*Vipera aspis*). **Hormones and Behavior**, v. 42, p. 135-147, 2002.

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

BAUWENS, D.; THOEN, C. Escape tactics and vulnerability to predation associated with reproduction in the lizard *Lucerta vivipara*. **Journal Animal Ecology**, v. 50, p. 733-743, 1981.

BEAUPRE, S. J.; DUVALL, D. J. Integrative biology of rattlesnakes. **BioSciences**, v. 48, p. 531-538, 1998.

BEHMER, A. O.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual techniques for normal and pathological histology**. São Paulo: Edart, 1976.

BELL, G. The costs of reproduction and Their Consequences. **American Naturalist**, v. 116, p. 45-76, 1980.

BETZ, T.W.. The ovarian histology of the diamond-backed watersnake, *Natrix rhombifera*, during the reproductive cycle. **Journal of Morphology**, v. 113, p. 245-260, 1963.

BIRCHARD, G.; BLACK, C.P; SCHUETT, G.; BLACK, V. Influence of pregnancy on oxygen consumption, heart rate and hematology in the garter snake: implications for the “cost of reproduction” in live bearing reptiles. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 77A, n. 3, p. 519-523, 1984.

BIRKHEAD, T.; MOLLER, A. Female control of paternity. **Tree**, v. 8, n. 3, p. 100-104, 1993.

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

BIZERRA, A.; MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Reproduction and feeding in the colubrid snake *Tomadon dorsatus* from south-eastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 26, p. 33-38, 2005.

BLACKBURN, D. G. Standardized criteria for the recognition of developmental nutritional patterns in squamate reptiles. **Copeia**, v. 3, p. 925-935, 1994.

BLEM, C. R. Biennial reproduction in snakes: An alternative hypothesis. **Copeia**, v. 2, p. 961-963, 1982.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: um revisão. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 7-16. 2003.

BOGERT, C. M.; ROTH, V. D. Ritualistic combat of male gopher snakes, *Pituophis melanoleucus affinis* (Reptilia, Colubridae). **American Museum Novitates**, v. 2245, p. 1908-1992, 1996

BONNET X.; BRADSHAW, S. D.; SHINE, R. Capital versus income breeding: an ectothermic perspective. **Oikos**, v. 83, p. 333-342, 1998.

BONNET, X. E NAULLEAU, G. Are body reserves important for reproduction in male dark green snakes (colubridae: *Coluber virififlavus*)? **Herpetologica**, v. 52, p. 137-146, 1996.

BONNET, X. The evolution of Semelparity. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. (Ed.) **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Enfield: Science Publishers, 2011. p. 645-674.

BONNET, X.; NAULLEAU, G.; MAUGET, R. The influence of body condition on 17 β -estradiol levels in relation to vitellogenesis in female *Vipera aspis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 93, p. 424-437, 1994

BONNET, X.; NAULLEAU, G.; SHINE, R.; LOURDAIS, O. What is the appropriate timescale for measuring costs of reproduction in a 'capital breeder' such as the aspic viper? **Evolutionary Ecology**, v. 13, p. 485-497, 1999.

BRODIE, III. E. D. Behavioral modification as a means of reducing the cost of reproduction. **The American Naturalist**, v. 134, n. 2, p. 225-238, 1989.

BROWN, W.S. Female reproductive ecology in a northern population of timber rattlesnake, *Crotalus horridus*. **Herpetologica**, v. 47, p. 101-115, 1991.

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

BURCHFIELD, P. D. Additions to the natural history of the crotalinae snake *Agkistrodon bilineatus taylori*. **Journal of Herpetology**, v. 16, p. 376-382, 1982.

CALE, W. G.; GIBBONS JR., J. W. Relationships between body size, size of the fat bodies, and total lipid content in the canebrake rattlesnake (*Crotalus horridus*) and the black racer (*Coluber constrictor*). **Herpetologica**, v. 28, p. 51-53, 1972

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

CARPENTER, C. C. Dominance in snakes. In: SEIGEL, R. A.; HUNT, L. E.; KNIGHT, J. L.; MALARET, L.; ZUSCHLAG, N. L. (Ed.). **Vertebrate ecology and systematics**, Museum of Natural History, University of Kansas, Lawrence, Kansas, USA, 1984. p. 195-2002.

CARPENTER, C. C.; GILLINGHAM, J. C. Postural responses to kingsnakes by Crotaline snakes. **Herpetology**, v. 31, n. 3, p. 293-302, 1975.

CHAPPLE, D.; SWAIN, R. Changes in reproductive investment following caudal autotomy in viviparous skinks (*Niveoscincus metallicus*): lipid depletion or energetic diversion? **Journal of Herpetology**, v. 36, p. 480–486, 2002.

CHARNOV, E. L. **The theory of sex allocation.** Princeton University Press, 1982.

CHIARAVIGLIO, M. The effects of reproductive condition on Thermoregulation in the argentina *Boa* (*Boa constrictor occidentalis*) (BOIDAE). **Herpetological Monographs**, v. 20, n. 1, p. 172-177, 2006.

CREWS, D.; GARSTKA, W. The ecological physiology of a garter snake. **American Scientific**, v. 247, p. 136-144, 1982.

DALRYMPLE, G. H.; STEINER, T. M.; NODELL, R. J.; BERNARDINO, J. S. Seasonal activity of the snakes of long pine key, Everglades National Park. **Copeia**, v. 1991, n. 2, p. 294-302, 1991.

DALY, M. The cost of mating. **The American Naturalist**, v. 112, n. 986, p. 771-774, 1978.

DERICKSON, W. K. Lipid storage and utilization in reptiles. **American Zoology**, v. 16, p. 711-723, 1976.

DERICKSON, W. K. Lipid deposition and utilization in the Sagebrush Lizard, *Sceloporus graciosus*: Its significance for reproduction and maintenance. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 49A, p. 267-272, 1974.

DESSAUER, H. C.; FOX, W. Changes in ovarian follicle composition with plasma levels of snakes during estrus. **American Journal Physiology**, v. 197, n. 2, p. 360-366, 1959.

DILLER, L. V.; WALLACE R. L. Reproductive biology of the northern pacific rattlesnake (*Crotalus viridis oregonus*) in northern Idaho. **Herpetologica**, v. 40, p. 182-193, 1984.

DUARTE M. R.; LAPORTA-FERREIRA, I. L. Some aspects of energetic reserves in Viperidae snakes (*Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca*) with considerations about captivity maintenance. **Boletim de Fisiologia Animal**, v. 14, p. 87-98, 1990.

DUVALL, D.; ARNOLD, S. J.; SHUETT, G. W. Pitiviper mating systems: Ecological potential, sexual selection and microevolution. In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE JR, E. D. (Ed.). **Biology of the pitvipers**. Tyler, Texas: Selva Press, 1992. p. 321-336.

DYKE, J. U. V.; BEAUPRE, S. J. Bioenergetic components of reproductive effort in viviparous snakes: Costs of vitellogenesis exceed costs of pregnancy. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular ; Integrative Physiology**, v. 160, n. 4, p. 504–515, 2011.

FITCH, H. Reproductive cycle of lizards and snakes: University of Kansas Publisher. Museum of Natural History. **Miscelanium Publications**, 1960. p. 1-247.

FITCH, H. Reproductive cycles in tropical reptiles. **Occasional Papers of the Museum of Natural History University of Kansas**, v. 96, p. 1-53, 1982.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-503, 1957.

FOX, H. The urogenital system of reptiles. In: GANS, C.; PARSONS, T. S. (Ed.). **Biology of the Reptilia**. New York: Academic Press, 1977. v. 6, p. 1-157.

FOX, W. Seasonal variation in the male reproductive system of Pacific coast garter snakes. **Journal of Morphology**, v. 90, p. 481-553, 1952.

FRINGS, C. S.; FENDLY, T. W.; DUNN, R. T.; QUENN, C. A. Improved determination of total lipids by supra-phospho-vanillin reaction. **Clinical Chemistry**, v. 18, p. 673-674, 1972.

FRISCH RE Menarche and fatness: reexamination of the critical body composition hypothesis. **Science**, v. 200, p. 1509-1513, 1978.

FRYE, FL. **Reptile care: an atlas of diseases and treatments**. Neptune: TFH Publications, 1999.

GANS, C. The visceral organs. In: GANS, C.; GAUNT, A. S. (Ed.). **Biology of the reptilia**. Society for the Study of Amphibians and Reptiles London: Academic Press, 1998. 660 p.

GANSER, R. L.; HOPKINS, W. A.; O'NEIL, L.; HASSE, S.; ROE, J.; SEVER, D.M. Liver histopathology of the Southern Watersnake, *Nerodia fasciata fasciata*, following chronic exposure to trace element-contaminated prey from a coal ash disposal site. **Journal of Herpetology**. v. 37, p. 219-226, 2003.

GARDNER-SANTANA, L. C.; BEAUPRE, C. S. Timber Rattlesnakes (*Crotalus horridus*) exhibit elevated and less variable body temperatures during pregnancy. **Copeia**, p. 363–368, 2009.

GELLER, A.; PETROVIC. L. M. **Biopsy Interpretation of the Liver**. 2nd ed. Philadelphia, Lippincott Williams, 2009.

- GERVASI, V.; BRUNBERG, S.; SWENSON, J. E. An individual-based method to measure animal activity levels: a test on brown bears. **Wildlife Society Bulletin**, v. 34, n. 5, p. 1314-1319, 2006.
- GIBBONS, J. W.; SEMLITSCH, R. D. Activity patterns. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S. (Ed.). **Snakes: ecology and evolutionary biology**. New York: McGraw-Hill Publishing Company, 1987. p. 396-421
- GIBBONS, J. W. Reproduction, growth and sexual dimorphism in the canebreak rattlesnake (*Crotalus horridus*). **Copeia**, v. 197, p. 222-226, 1972.
- GILLINGHAM, J. C.; CARPENTER, C. C.; MURPHY, J. B. Courtship, male combat and dominance in the western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*. **Journal of Herpetology**, v. 17, n. 3, p. 265-270, 1983.
- GLAUDAS, X.; RODRÍGUEZ-ROBLES, J. A. Vagabond males and sedentary females: spatial ecology and mating system of the Speckled Rattlesnake (*Crotalus mitchellii*). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 103, p. 681-695, 2011
- GOLDBERG, S. R. Reproductive cycle of the ovoviviparous iguanid lizard *Sceloporus jarrovi*. **Herpetologica**, v. 27, p. 123-131, 1971.
- GOMES, C. A.; MARQUES, O. A. V. Food habits, reproductive biology, and seasonal activity of the dipsadid snake, *Echinanthera undulata* (Wied, 1824), from the atlantic forest in southeastern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 7, n. 3, p. 233-240, 2012.
- GRAVES, B. M.; DUVALL, D. Reproduction, rookery use, and thermoregulation in free-ranging, pregnant *Crotalus v. viridis*. **Journal of Herpetology**, v. 27, p. 33-41, 1993.
- GREGORY, P.; MACARTNEY, J.; LARSEN, K. Spatial patterns and movements. In: SEIGEL, R.; COLLINS, J.; NOVAK, S. (Ed.). **Snakes: ecology and evolutionary biology**. New York: MacMillan Publ. Comp., 1987. p. 366-395.
- GREGORY, P. T. Reptilian hibernation. In: GANS, C.; POUGH, F.H. (Ed.). **Biology of the Reptilia**. London: Academic Press, 1982. p. 53-154.
- GREGORY, P. T.; CRAMPTON, L. H.; SKEBO, M. K. Conflicts and interactions among reproduction, thermoregulation and feeding in viviparous reptiles: are gravid snakes anorexic? **Journal of Zoology**, v. 248, p. 231-241, 1998.
- HACK, M. H.; HELMY, F. M. Analysis of melanoprotein from *Amphiuma* liver and from a Nhuman liver melanoma. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 116, n. 2, p. 348-350, 1964.
- HAHN, W. E.; TINKLE, D. W. Fatbody cycling and experimental evidence for its adaptative significance to ovarian follicle development in the lizard *Uta stansburiana*. **Journal Experimental Zoology**, v. 158, p. 79-86, 1965.
- HARTMANN, M.T.; DEL GRANDE, M.; GONDIM, M.G.C.; MENDES, M. C.; MARQUES, O.A.V. Reproduction and Activity of the Snail-Eating Snake, *Dipsas albifrons*

(Colubridae), in the Southern Atlantic Forest in Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 37, n. 2, p. 111-114, 2002.

HERSEK, M. J.; OWINGS, D. H.; HENNESSY, D. F. Combat between Rattlesnakes (*Crotalus viridis oreganus*) in the Field. **Journal of Herpetology**, v. 26, n. 1, p. 105-107, 1992.

HO, S. M.; KLEISS, S.; MACPHERSON, R.; HEISERMANN, J.; CALLARD, I. P. Regulation of vitellogenesis in reptiles. **Herpetologica**, v. 38, p. 40-50, 1982.

HOLMES, K.M.; A. CREE. Annual reproduction in females of a viviparous skink (*Oligosoma maccanni*) in a subalpine environment. **Journal of Herpetology**, v. 40, p. 141-151, 2006.

HOUSTON, D. L; SHINE, R. Population demography of Arafurae filesnakes (Serpentes: Acrochordidae) in tropical Australia. **Journal of Herpetology**, v. 28, p. 273-280, 1994.

HUBERT, J. The origin and development of oocytes. In: GANS, C.; BILLET, F.; MADERSON, P. F. A. (Ed.). **Biology of the Reptilia**, New York: Willey, 1985. v.14, p. 41-74.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F. Variação anual do sistema reprodutor de fêmeas de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae). **Iheringia**, v. 94, n. 3, p. 325-328, 2004.

JI, X.; WANG, P. C. The efect of temperature on food intake and assimilation and efficiency of the gecko *Gekko japonicus*. **Journal. Hangzhou Normal College**, v. 90, n. 6, p. 90-94, 1990.

JONSSON, K. I. Capital and income breeding as alternative tactics of resource use in reproduction. **Oikos**, v. 78, p. 57-66, 1997.

JUNQUEIRA L. C. U.; CARNEIRO, J.. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 432 p.

KELLEWAY, L. G. Competition for mates and food items in *Vipera berus* (L.). **Br. J. Herpetology**, v. 6, p. 225-230, 1982.

KING, M. B.; DUVALL, D. Praire rattlesnake seasonal migrations: episodes of moviment, vernal foraging and sex differences. **Animal Behavior**, v.39, p. 924-935, 1990.

KLAUBER, L. M. **Rattlesnakes, their habits, life histories and influence on manking** Berkley: University of California Press for the Zoological Society of San Diego, 1972.

KLIMSTRA, W. D. Some observations on snake activities and populations. **Ecology**, v. 39, p. 232-239, 1958.

KOKKO, H.; WONG, B. B. M. What determines sex roles in mate searching? **Evolution**, v. 61, p. 1162-1175, 2007.

KROMER, 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, 70-80, 2004.

LANDRETH, H. F. Orientation and behavior of the Rattlesnake *Crotalus atrox*. **Copeia**, v. 1, p. 26-31, 1973.

LANGLADA, F. Ciclo sexual bienal de serpentes *Crotalus* do Brasil - Comprovação. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 36, p. 67-72, 1972.

LILLYWHITE, H. B. Temperature, energetics and physiological ecology. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S. (Ed.). **Snakes: ecology and evolutionary biology**. New York: Macmillan, 1987. p. 422-477.

LOURDAIS, O.; BONNET, X.; SHINE, R.; TAYLOR, E. When does a reproducing female viper “decide” on her litter size? **Journal of Zoology**, v. 259, p. 123-129, 2003.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurament with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUISELLI, L. The mating strategy of the European adder, *Vipera berus*. **Acta Oecologia**, v. 16, p. 375-388, 1995.

MACARTNEY, J. M.; GREGORY, P. Reproductive biology of female rattlesnakes (*Crotalus viridis*) in British Columbia. **Copeia**, v. 1, p. 47-57, 1988.

MADSEN, T.; SHINE, R. Costs of reproduction in a population of European adders. **Oecologia**, v. 94, p. 488-495, 1993.

MADSEN, T.; SHINE, R. Rain, fish and snakes climatically driven population dynamics of Arafura filesnakes in tropical Australia. **Oecologia**, v. 124, p. 208-215, 2000.

MADSEN, T.; SHINE, R. Temporal variability in sexual selection acting on reproductive tactics and body size in male snakes. **The American Naturalist**, v. 141, n. 1, p. 167-171, 1993.

MARINHO, P. S. **Variação sazonal da temperatura corpórea de *Crotalus durissus* em cativeiro semi-extensivo: Fêmeas prenhes mantém temperaturas mais altas?** 2012. 87 f. Monografia (Trabalho Conclusão de Curso) - Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2012.

MARINHO, C. E.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; CARNEIRO, S. M.; YAMASAKI, S. C.; SILVEIRA, P. F. Peptidase activities in *Crotalus durissus terrificus* semen. **Reproduction**, v. 136, p. 767-776, 2008.

MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; RODRIGUES, M. G.; CAMARGO, R. Mating and reproductive cycle in Neotropical colubrid snake *Chironius bicarinatus*. **South American Journal of Herpetology**, v. 4, n. 1, p. 76-80, 2009.

MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; RODRIGUES, M.; CAMARGO, R. Mating and reproductive cycle in the neotropical colubrid snake *Chironius bicarinatus*. **South American Journal Herpetology**, v. 4, p. 76–80, 2009.

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.; ETEROVIC, A.; ENDO, W. Seasonal activity of snakes in the Atlantic forest in southeastern Brazil. **Amphibia Reptilia**, v. 20, p. 103-111, 2001.

MARQUES, O. A. V.; PUORTO, G. Feeding, reproduction and growth in the crowned snake *Tantilla melanocephala* (Colubridae), from southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 19, p. 311-318, 1998.

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.

MARTIN, W. H. Phenology of the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) in an unglaciated section of the Appalachian mountains. In: CAMPBELL J. A; BRODIE, JR. E. D. (Ed.). **Biology of the Pitvipers**. Tyler, Texas: Selva, 1992. p. 259-277.

MASON, R. T.; ROCKWELL, M. P. Social behavior and pheromones **Journal Comparative Physiology**, v. 196, p. 729–749, 2010.

MATHIES, T. Reproductive cycles of tropical snakes. In: ALDRIDGE R. D.; SEVER, D. M. (Ed.). **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Enfield: Science Publishers, 2011. p. 511–550.

MATHIES, T.; CRUZ, J. A.; LANCE, V. A.; SAVIDGE, J. A. Reproductive biology of male brown tree snakes (*Boiga irregularis*) on Guam. **Journal of Herpetology**, v. 44, p. 209-221, 2010.

MAY, P. G.; FARRELL, T. M.; HEULETT, S. T.; PILGRIM, M. A.; BISHOP, L. A.; SPENCE, D. J.; RABATSKY, A. M.; CAMPBELL, M. G.; AYCRIGG, A. D.; RICHARDSON, W. E. II. Seasonal Abundance and Activity of a Rattlesnake (*Sistrurus miliarius barbouri*) in Central Florida. **Copeia**, v. 2, p. 389-401, 1996.

MEDEIROS, C. R.; HESS, P. L.; NICOLETI, A. F.; SUEIRO, L. R.; DUARTE, M. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; FRANÇA, F. O. S. Bites by the colubrid snake *Philodryas patagoniensis*: A clinical and epidemiological study of 297 cases **Toxicon**, v. 56, p. 1018–1024, 2010.

MILLAR, J. S. Tactics of energy partitioning in breeding *Peromyscus*. **Canadian Journal Zoology**, v. 53, p. 967-976, 1987.

MILLIGAN, C. L.; GIRARD, S. S. Lactate metabolism in rainbow trout. **Journal of Experimental Biology**, v. 180, p. 175-193, 1993.

MUNIZ-DA-SILVA, D. F. **Ciclo reprodutivo da caninana, *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758) (SERPENTES: COLUBRIDAE)**. 2012. 135 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

NILSON, G. Ovarian cycle and reproductive dynamics in the female adder, *Vipera berus* (Reptilia, Viperidae) **Amphibia-Reptilia**, v. 2, p. 63-82, 1981.

NILSON, G.; ANDRÉN, C. Function of renal sex secretion and male hierarchy in the adder *Vipera berus*. **Hormones and Behavior**, v. 16, p. 404-413, 1982.

NOGUEIRA, C., SAWAYA, R. J.; MARTINS, M.. Ecology of the pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 37, p. 653-659, 2003.

OLIVEIRA, E.; MARTINS, M. When and where to find a pitviper: activity patterns and habitat use of the lancehead, *Bothrops atrox*, in Central Amazonia, Brazil. **Herpetological Natural History**, v. 8, n. 2, p.101–110, 2001.

OLSSON, M.; MADSEN, T.; SHINE, R. Is sperm really so cheap? Costs of reproduction in male adders, *Vipera berus*. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 264, p. 455–459, 1997.

PARANJAPE, S. Y. The anatomy of the garden lizard (*Calotes versicolor*, Bouln.). University of Poona. **Zoological Monograph**, Poona University Press, Poona-7, India. 1974.

PARKER, M. R.; MASON, R. T. Pheromones in snakes: history, patterns and future research directions. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. (Ed.). **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Enfield, NH: Science Publishers/CRC Press, 2011. p. 551-572

PIZZATO, L.; MANFIO, R. H.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Male-male ritualized combat in the Brazilian rainbow boa, *Epicrates cenchria crassus*. **Herpetological Bulletin**, v. 95, p. 16-20, 2006.

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

PIZZATTO, L.; MARQUES, O. A. V. Reproductive biology of the false coral snake *Oxyrhopus guibei* from southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 23, p. 495-504, 2002.

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

PLUMMER, M. Annual variation in store lipids and reproduction in green snakes (*Opheodrys aestivus*). **Copeia**, p. 741-745, 1983.

POND, C. M. Storage. In: TOWNSEND, C. R.; CALOW, P. (Ed.). **Physiological ecology: an evolutionary approach to resource use**. Blackwell: Oxford, 1971. p. 190-219.

POUGH, F. H.; ANDREWS, R. M.; CADLE, J. E.; CRUMP, M. C. **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 1981.

PRESTT, I. An ecological study of the viper *Vipera berus* in southern Britain. **Journal of Zoology London**, v. 164, p. 272-418, 1971.

RIVAS, J. A.; BURGHARDT, G. M. Snake mating systems, behavior, and evolution: the revisionary implications of recent findings. **Journal of Comparative Psychology**, v. 119, n. 4, p. 447-454, 2005.

ROBERT T. MASON, R. T.; PARKER, M. R. Social behavior and pheromonal communication in reptiles. **Journal Comparative Physiology A**, v. 196, p. 729-749, 2010.

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, p. 215-228, 2013.

ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S.M. Influência do ciclo do segmento sexual renal na determinação do acasalamento em *Sibynomorphus mikanii* (Serpentes, Dispsadinae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 54-56, 2008.

SAINT GIRONS, H. Reproductive cycle of male snakes and their relationship whit climate and female reproductive cycle. **Herpetologica**, v. 8, p. 5-16, 1982.

SALOMÃO, M. G. ; ALMEIDA-SANTOS, S. M. The reproductive cycle of male neotropical Rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*). In: HÖGGREN, M.; SCHUETT, G. W.; GREENE, H.; DOUGLAS, M. E. (Ed.). **Biology of the Vipers**. Eagle Mountain: Eagle Mountain Publishing, 2002. p. 507-514.

SALOMÃO, M. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; PUORTO, G. Activity patterns of *Crotalus durissus* (Viperidae, Crotalinae): Feeding, Reproduction and Snakebite. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 30, n. 2, p. 101-106, 1995.

SANTOS, L. R.; MOURA, A. L. Q.; BELLETI, M. E.; VIEIRA, L. G.; ORPINELLI, S. R. T.; DE SIMONE, S. B. S. Morphological aspects of the liver of the freshwater turtle *Phrynops geoffroanus* Schweigger, 1812 (Testudines, Chelidae). **Brazilian Journal of Morphology Science**, v. 26, n. 3-4, p. 129-134, 2009.

SANTOS, X.; LLORENTE, G. A. Lipid dynamics in the viperine snake, *Natrix maura*, from the Ebro Delta (NE Spain). **Oikos**, v. 105, p. 132-140, 2004.

SANTOS, X.; LLORENTE, G. A. Seasonal variation in reproductive traits of the oviparous water snake, *Natrix maura*, in the Ebro Delta of Northeastern Spain. **Journal of Herpetology**, v. 35, p. 653-660, 2001.

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

SANYAL, M. K.; PRASAD, M. R. N. Sexual segment of the kidney of the Indian House lizard, *Hemidactylus flaviviridis* Ruppell. **Journal of Morphology**, v. 118, p. 511–528, 1996.

SCHAFFNER, F. The liver. In: GANS, C. (Ed.). **Visceral organs**. Philadelphia: Saunders, 1998. p. 485-531.

SCHENEIDER, J. E. Energy balance and reproduction. **Physiology and Behavior**, v. 81, p. 289-317, 2004.

SCHERIDAN, M. A. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 107, p. 495-508, 1994.

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.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. (Ed.). **Biology of the vipers**. Carmel Indiana: Eagle Mountain, 2002. p. 515-532.

SCHUETT, G. W. Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers? In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE, E. D. (Ed.). **Biology of Pitvipers**. Tyller: Selva, 1992. p. 199-216.

SCOTT, D. E.; FISHER, R. U.; CONGDON, J. D.; BUSA, S. P. Whole body lipid dynamics and reproduction in the cottenmouth *Agkistrodon piscivourous*. **Herpetologica**, v. 51, p. 472-487, 1995.

SECOR, S. M. A preliminary analysis of the movement and home range size of the sidewinder, *Crotalus cerastes*. In: SCHUETT, G. W.; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. (Org.). **Biology of the Vipers**. Carmel: Indiana, 2002. p. 389-394.

SEIGEL, R. A.; FORD, N. B. Reproductive Ecology. In: R.A. SEIGEL, J. T.; COLLINS, (Ed.). **Snakes: ecology and evolutionary biology**. New York: MacMillan, 1987. p. 210-252.

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.

SHAFER, W. M. Selection for optimal life-histories: the effects of age structure. **Ecology**, v. 55, p. 291-303, 1974.

SHAW, C. E. Male combat in American colubrid snakes with remarks on combat in other colubrid and elapid snakes. **Herpetologica**, v. 7, p. 149-168, 1951.

SHINE, R. "Costs" of reproduction in reptiles. **Oecologia**, v. 46, p. 92-100, 1980.

SHINE, R. Relative clutch mass and body shape in lizards and snakes: is reproductive investment constrained or optimized? **Evolution**, v. 46, p. 828-833, 1992.

SHINE, R. Reproductive strategies in snakes. **Royal Society Publishing**, v. 270, p. 995-1004, 2003.

SHINE, R. Sexual Size Dimorfism in Snakes Revisited. **Copeia**, v. 2, p. 325-346, 1994.

SHROMA, H. Follicular growth and fat body cycle of female habus, *Trimeresurus flavoviridis*, in the Okinawa Islands. **Japanese Journal of Herpetology**, v. 15, n. 2, p. 53-58, 1993.

SMYTH, M. Changes in the fat stores of the skinks, *Morethia boulengeri* and *Heriergis peronii* (Lacertilia). **Australian Journal. Zoology**, v. 22, p. 135-145, 1975.

STARCK, J. M., CRUZ NETO, A. P.; ABE, A. S. Physiological and morphological responses to feeding in broad-nosed caiman (*Caiman latirostris*). **Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 2033-2045, 2007.

STARCK, M. J.; BEESE, K. Structural flexibility of the small intestine and liver of garter snakes in response to feeding and fasting. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, p. 1377-1388, 2002.

STERN, S. C. Life-history tactics: a review of ideas. **The Quarterly Review of Biology**, v. 51, p. 3-47, 1976.

STEWART, J. R. Placental structure and nutritional provision to embryos in predominantly lecithotrophic viviparous reptiles. **American Zoology**, v. 32, p. 303-312, 1992.

SUEIRO, L. R.; ROJAS, C. A.; RISK, J. Y.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Anomalias cromáticas em *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): Xantismo interfere na sobrevivência? **Biotemas**, v. 23, n. 1, p. 155-160, 2010.

TELEMENCO, R. S.; BAIRD, T. Capital energy drives production of multiple clutches whereas income energy fuels growth in females collared lizard *Crotaphytus collaris*. **Oikos**, v. 120, p. 915-921, 2011

TELFORD JR, S. R. Seasonal fluctuations in liver and kidney weights of the Japanese lacertid *Tachydromus tachydromoides*. **Copeia**, p. 681-689, 1970.

TINKLE, D. W. Reproductive potential and cycles in female *Crotalus atrox* from Northwestern Texas. **Copeia**, p. 306-313, 1962.

TORRELLA-VIERA, N. F.; ARAÚJO, D. P.; BRAZ, H. B. Annual and daily activity patterns of the snail-eating snake *Dipsas bucephala* (Serpentes, Dipsadidae) in southeastern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 73, p. 252-258, 2012.

TOZETTI, A. M. **Uso do ambiente, atividade e ecologia alimentar da cascavel (*Crotalus durissus*) em área de Cerrado na região de Itirapina-SP.** 2006. 93 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2006.

TRIVERS, R. L. Parental investment and sexual selection. In: CAMPBELL, B. (Ed). **Sexual selection and the descent of man.** Chicago: Aldine-Atherton, 1972. p. 136-179.

TURNER, F. B. The dynamics of populations of Squamates, Crocolians by a desert lizard (*Uta stansburiana*). US/IBP. **Biomedical Monographs**, v. 1. p. 57-69, 1976.

VAINIO, I. Zur verbreitung und biologie der Kreuzotter, in Finland. **Animale Societé**, v. 12, p. 1-19, 1931.

VOLSOE, H. Structure and seasonal variation of the male reproductive organs of *Vipera bevus* (L.). **Spolia Zoology Museumm Hauniensis**, v. 5, p. 1-159, 1944.

WHARTON, C. H. Reproduction and growth in the cottonmouths, *Agkistrodon piscivorous* Lacepede, of Cedar Keys, Florida. **Copeia**, p. 149-161, 1996

WHITE, M. E. Oogenesis and early embriogenesis, In: ALDRIDGE, R.D.; SEVER, D.M. (Ed.). **Snakes reproductive biology and philogeny.** Enfield: Science Publishers, 2011. p. 97-118.

WHITTIER, J. M.; CREWS, D. Body mass and reproduction in female Red-Sided Garter Snakes (*Thamnophis sirtalis parietalis*). **Herpetologica**, v. 46, n. 2, p. 219-226, 1992.

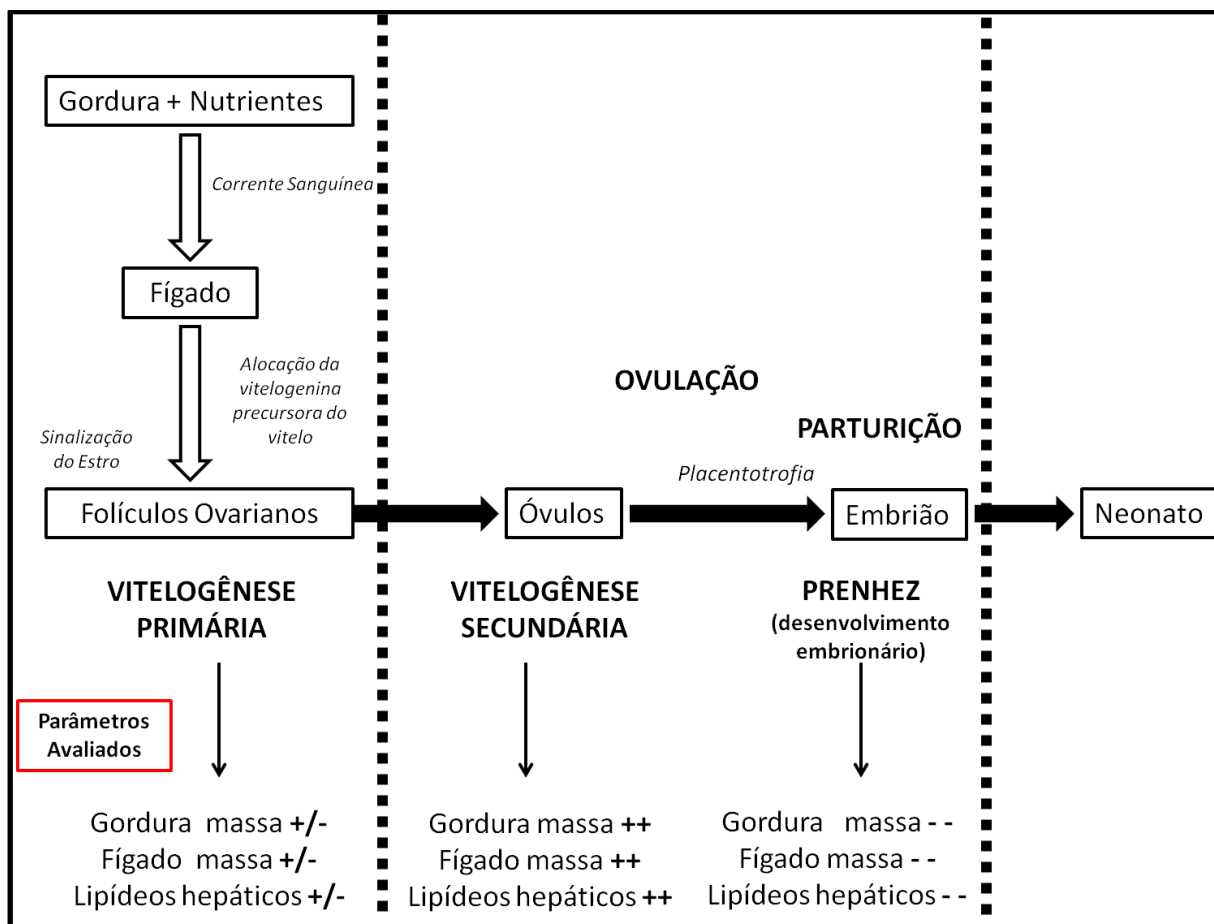
WILLIAMS, G. C. **Sex and evolution.** Princeton, N.J.: Princeton University Press, 1975.

WINNE, C. T.; WILSON, J. D.; GIBBONS, J. W. Income breeding allows na aquatic snake *Seminatrix pygaea* to reproduce normally following prolonged drought induced aestivation, **Journal of Animal Ecology**, v. 75, p. 1352-1360, 2006.

YOKOYAMA, F; YOSHIDA, H. The reproductive cycle of the female habu, *Tnimeresurus flavoviridis*. **Journal of Herpetology**, v. 28, p. 54-59, 1994.

ZACARIOTTI, R. L.; DURRANT, B. Assisted reproduction in snakes. **CRES Report**, v. 1, p. 32-35, 2006.

APÊNDICE – Esquema representativo da mobilização dos substratos energéticos em fêmeas de *C. durissus* ao longo dos estágios reprodutivos.



Legenda – Observar a variação dos valores dos parâmetros avaliados. Representação dos valores dos parâmetros avaliados: +/- valores intermediários; ++ valores máximos; - - valores mínimos.