Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados

Selma M. Almeida-Santos[1,4,5], Henrique B. Braz[1,4], Lívia C. Santos[1,4], Letícia R. Sueiro[1,4], Verônica A. Barros[1,2,4], Claudio A. Rojas[3,4], Karina N. Kasperoviczus[1,4]

[1] *Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan – Avenida Vital Brazil, 1.500, Butantã, CEP 05503900, São Paulo, SP, Brasil.*
[2] *Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal – Rua Cristóvão Colombo, 2.265, Jardim Nazareth, CEP 15054000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.*
[3] *Departamento de Neurologia Experimental, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Rua Pedro de Toledo, 669 – Edifício de Pesquisa II (1º e 2º andares), Vila Mariana, CEP 04039032, São Paulo, SP, Brasil.*
[4] *Grupo de Estudos em Reprodução de Squamata (www.reproducaosquamata.com.br).*
[5] *Autor para correspondência: selma.santos@butantan.gov.br*

INTRODUÇÃO

A biologia reprodutiva de serpentes compreende diversos tópicos como modos reprodutivos, ciclos reprodutivos, fecundidade (tamanho da ninhada, tamanho dos filhotes, massa relativa da ninhada e frequência reprodutiva; *sensu* Seigel e Ford, 1987), idade e tamanho na maturidade, dimorfismo sexual, sistemas de acasalamento e comportamentos reprodutivos como corte e cuidado parental (Seigel e Ford, 1987; Shine, 2003; Shine e Bonnet, 2009). Assim, estudos sobre reprodução são essenciais para a compreensão da biologia de qualquer espécie. Além disso, dados sobre a biologia reprodutiva são importantes para a definição de estratégias de conservação para espécies ameaçadas de extinção (Shine e Bonnet, 2009). Apesar disso, serpentes da região neotropical eram até pouco tempo relativamente pouco estudadas com relação à reprodução (Seigel e Ford, 1987). No entanto, esse cenário mudou consideravelmente ao longo das duas últimas décadas. Diversos estudos, principalmente no Brasil, têm produzido uma quantidade substancial de informação, aumentando assim significativamente nosso conhecimento sobre a reprodução de serpentes neotropicais (*e.g.,* Marques, 1996; Marques e Puorto, 1998; Aguiar e Di-Bernardo, 2005; Almeida-Santos *et* al., 2004, 2006; Pinto e Fernandes, 2004; Alves *et al.,* 2005; Balestrin e Di-Bernardo, 2005; Pizzatto, 2005; Ávila *et al.,* 2006, 2010; Marques e Muriel, 2007; Maschio *et al.,* 2007; López e Giraudo, 2008; Pizzatto *et al.,* 2008; Leite *et al.,* 2009; López *et al.,* 2009; Pinto *et al.,* 2010; Zanella e Cechin, 2010; Oliveira *et al.,* 2011; Mesquita *et al.,* 2011, 2013; Alencar *et al.,* 2012; Gomes e Marques, 2012; Bellini *et al.,* 2013; Marques *et al.,* 2013; Panzera e Maneyro, 2013; Siqueira *et al.,* 2013; Sousa *et al.,* 2014). Todo esse volume de dados tem permitido a elaboração e teste de hipóteses sobre padrões reprodutivos (*e.g.,* Almeida-Santos e Salomão, 2002; Barros *et* al., 2012).

No entanto, algumas revisões e evidências recentes (Mathies, 2011; Barros *et* al., 2012, 2014; Mesquita *et al.,* 2013; Rojas *et al.,* 2013; Braz *et al.,* 2014) têm levantado algumas questões importantes em reprodução de serpentes. Nosso objetivo nesse artigo é chamar atenção para tais questões, discutindo a necessidade de se avaliar mais criticamente a forma como os dados são coletados, examinados e interpretados, bem como apresentar recomendações sobre o tema com o intuito de contribuir para a melhoria da qualidade dos trabalhos produzidos. Dessa forma, os seguintes tópicos são discutidos: anatomia do trato reprodutor, ciclos reprodutivos, fecundidade (tamanho da ninhada, massa relativa da ninhada e produção de múltiplas ninhadas) e dimorfismo sexual, que são os mais comumente abordados em estudos de reprodução.

ANATOMIA MACROSCÓPICA

A ampla maioria dos estudos de reprodução de serpentes feitos no Brasil resulta da dissecção e exame do trato reprodutor de espécimes preservados em coleções científicas. Assim, a correta identificação e caracterização macroscópica das estruturas anatômicas do trato reprodutivo é imprescindível para uma coleta de dados passível de gerar dados confiáveis. Quando não há familiaridade com a anatomia, pode haver erros de identificação entre diferentes estruturas anatômicas.

O sistema reprodutivo de fêmeas de serpentes é composto por dois ovários alongados, dispostos assimetricamente, e um par de ovidutos situados lateralmente aos ovários. Em algumas espécies de serpentes basais, o oviduto esquerdo é reduzido ou ausente (Aldridge, 1992; Blackburn, 1998). Os ovidutos apresentam regiões macroscopicamente e histologicamente distintas. Há algumas propostas de nomenclatura para estas regiões (Girling, 2002; Siegel *et* al., 2011) e neste trabalho seguiremos a proposta de Siegel *et al.* (2011), que propõem a divisão do oviduto em infundíbulo anterior, infundíbulo posterior, útero glandular e útero aglandular. Sem conhecimento prévio, alças intestinais e lobos dos rins podem, por exemplo, ser confundidos com folículos ovarianos em desenvolvimento (Fig. 1), especialmente em espécimes mal preservados ou fixados há muito tempo, que podem apresentar estruturas anatômicas com deformidades.

O sistema reprodutor de machos de serpentes compreende um par de testículos quase sempre alongados e cilíndricos, dispostos assimetricamente (Gribbins e Rheubert, 2011; Fig. 2). Ao deixar os testículos, os espermatozoides passam

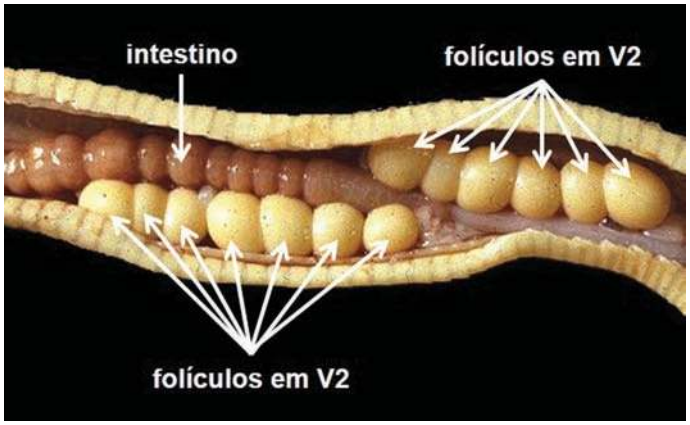


Figura 1: Fêmea de *Bothrops* sp. apresentando folículos em vitelogênese secundária. Foto: Otavio A. V. Marques.

pelos ductos da bainha epididimal (*rete testis,* dúctulos eferentes e ductos epididimários) (Sever, 2010; Trauth e Sever, 2011), chegando então ao ducto deferente (Fig. 2), um túbulo visível macroscopicamente que se estende em direção caudal até se abrir na cloaca (Volsøe, 1944; Trauth e Sever, 2011). É importante notar que em alguns trabalhos há uma confusão na nomenclatura, com o ducto deferente sendo nomeado equivocadamente como ducto eferente (Shine, 1978a, 1980a; 1988a; Shine e Covacevich, 1983; Marques, 1996; Shine *et* al., 1996; Marques e Puorto, 1998; Keogh *et al.,* 2000; Hartmann *et al.,* 2002; Cottone e Bauer, 2009; Ávila *et al.,* 2010; Zanella e Cechin, 2010; Ahmadzadeh *et al.,* 2011).

CICLOS REPRODUTIVOS

O ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de serpentes abrange diversos eventos como gametogênese, crescimento folicular, acasalamento, estocagem de esperma, ovulação, gravidez/gestação e época de nascimento dos filhotes. Todos esses eventos devem ser considerados para um completo entendimento do ciclo de qualquer espécie.

Fêmeas

Os folículos ovarianos observáveis a olho nu são categorizados em dois estágios: folículos em vitelogênese primária e folículos em vitelogênese secundária (Aldridge, 1979). Os folículos

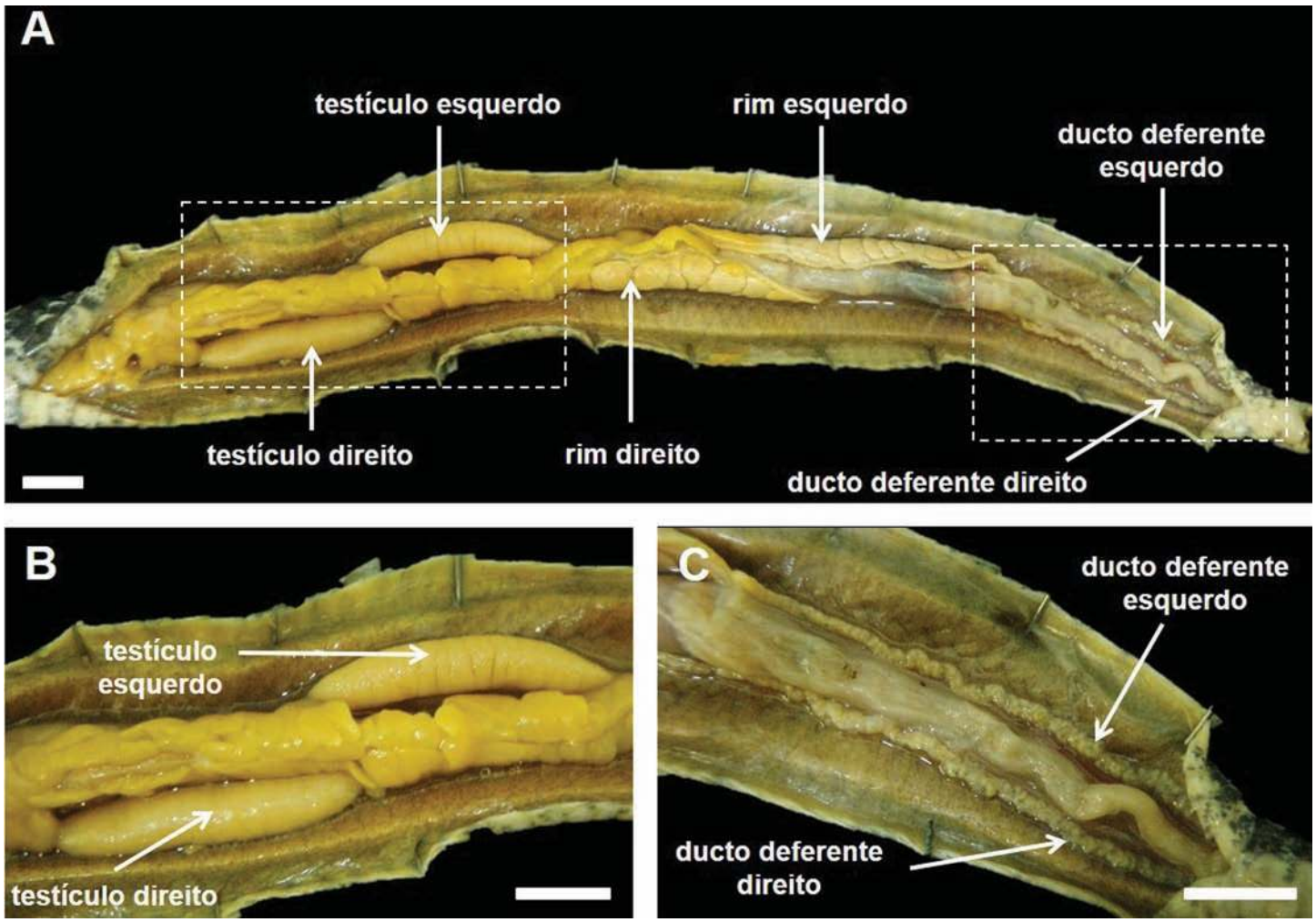


Figura 2: Macho de *Xenodon* sp. ilustrando todo o trato urogenital (A). Em detalhe observa-se os testículos (B) e ductos deferentes enovelados (C). Barra de escala = 1 cm. Foto: Henrique B. Braz.

primários, de crescimento lento, contêm grandes quantidades de proteínas e lipídios e pequena quantidade de cálcio. Quando o oócito inicia sua fase de acúmulo de vitelo (*i.e.,* vitelogênese secundária), ocorre o acréscimo de cálcio, lipídios, proteínas e fosfoproteínas (Aldridge, 1979). Dessa forma, o início da fase de vitelogênese secundária pode ser averiguado por meio de análises histológicas e histoquímicas (*e.g.,* Kasperoviczus, 2009; Santos, 2009).

Devido ao crescimento pronunciado na fase de vitelogênese secundária, o comprimento aproximado dos folículos no início do depósito secundário de vitelo também pode ser estimado por meio de um gráfico de dispersão. Dados do comprimento do maior folículo encontrado em cada fêmea dissecada são plotados em um gráfico no qual o eixo Y representa os comprimentos foliculares e o eixo X as datas de morte dos exemplares amostrados. A distribuição obtida normalmente mostrará uma concentração de pontos na parte inferior do gráfico, composta essencialmente por folículos primários, e pontos mais dispersos a partir de uma certa faixa de comprimento, indicando folículos com maior taxa de crescimento, os folículos secundários. A análise desse gráfico permite distinguir entre folículos primários e secundários além de identificar o comprimento folicular e a época em que a vitelogênese secundária tem início, bem como sua extensão. Porém, é relativamente comum encontrar na literatura a determinação do estágio vitelogênico de um folículo baseada em medidas pré-estabelecidas para outras espécies, como acima de 5 ou 10 mm (*e.g.,* Marques, 1996; Aguiar e Di-Bernardo, 2005; Pizzatto, 2005; Maschio *et al.,* 2007; Mesquita *et al.,* 2011; Alencar *et al.,* 2012; Bellini *et al.,* 2013), o que pode incorrer em erros na avaliação da fase reprodutiva em que se encontra uma fêmea, pois o comprimento folicular no qual se inicia a vitelogênese secundária varia entre as espécies. Isso pode levar a interpretações equivocadas dos ciclos reprodutivos e do tamanho em que a maturidade sexual é atingida nas fêmeas, uma vez que muitos estudos utilizam o comprimento rostro-cloacal (CRC) da menor fêmea em vitelogênese secundária como critério para avaliação da maturidade em toda população. Por exemplo, a Fig. 3 ilustra o ciclo reprodutivo de uma espécie hipotética. Se partirmos de valores estabelecidos *a priori* de que a vitelogênese ocorre com folículos a partir de 5 ou 10 mm (como frequentemente observado na literatura) iremos inferir erroneamente que ela acontece ao longo do ano ou a partir de agosto, respectivamente, quando na verdade ela tem início em maio, quando os folículos começam a aumentar de tamanho (a partir de 7 mm) e se estende até o início de janeiro (Fig. 3). Assim, o tamanho dos folículos secundários deve ser determinado para cada espécie estudada e somente após a coleta de dados, construção e análise do gráfico de folículos e não *a priori* (*e.g.,* Leite *et* al., 2009; Mesquita *et al.,* 2013; Braz *et al.,* 2014).

Durante a dissecção de uma fêmea com oócitos muito aumentados, é importante ter cautela para determinar corretamente se essas estruturas se localizam nos ovidutos ou nos ovários, e assim definir se a fêmea examinada apresenta ovos ou folículos pré-ovulatórios em vitelogênese avançada (Fig. 4). Quando se observam folículos aumentados no ovário, é possível notar folículos primários intercalados aos secundários, e o oviduto pode ser localizado ao lado do agrupamento de folículos, facilitando a confirmação de que esses são pré-ovulatórios (Fig. 4A). Quando se observam ovos nos ovidutos, pode-se localizar o prolongamento dos ovidutos após a região onde se encontram os ovos, e os ovários podem ser encontrados paralelamente a essas estruturas (Fig. 4B).

Outro fator importante a ser considerado no ciclo reprodutivo de fêmeas é a estocagem de esperma. A ocorrência de estocagem de esperma em uma espécie pode ser sugerida por dados indiretos, como a ocorrência de posturas ou parturições em fêmeas mantidas isoladas de machos ou pela dissociação entre as épocas de acasalamento e ovulação (Almeida-Santos e Salomão, 1997, 2002; Hartmann *et* al., 2004; Booth e Schuett, 2011; Rojas *et al.,* 2013; Silva *et al.,* 2014). Porém, é importante destacar que a confirmação de estocagem só pode ser obtida com o uso de técnicas de microscopia. Fêmeas de serpentes podem estocar esperma em duas regiões diferentes do oviduto. No infundíbulo posterior, podem ocorrer túbulos de estocagem, no interior dos quais os espermatozoides são mantidos (Fox, 1977; Saint Girons, 1985; Blackburn, 1998; Siegel *et* al., 2011; Rojas, 2013). Já a estocagem no útero aglandular ocorre por meio de uma contração da musculatura uterina (*Uterine Muscular Twisting,* UMT), documentada em crotalíneos e facilmente identificável macroscopicamente (Almeida-Santos e Salomão, 1997, 2002; Barros *et* al., 2012, 2014).

A época de recrutamento (*i.e.,* o período em que os recém-nascidos são incorporados na população) é outro componente importante do ciclo reprodutivo. Essa informação é algumas vezes inferida indiretamente, observando-se a época em que indivíduos com tamanho corpóreo de recém-nascidos são coletados na natureza (Maschio *et* al., 2007; Orofino *et al.,* 2010; Braz *et al.,* 2014). De forma direta, a época de recrutamento é determinada utilizando-se dados de eclosão ou nascimentos em laboratório ou na natureza (Balestrin e Di-Bernardo, 2005; Oliveira *et* al., 2011; Barros *et al.,* 2012). No entanto, a temperatura experimentada pelos ovos/embriões durante o

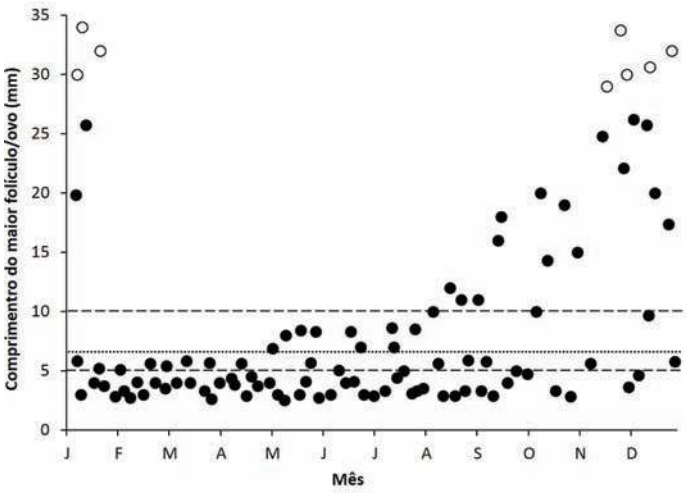


Figura 3: Variação sazonal no diâmetro do maior folículo ovariano (círculos pretos) e ovos (círculos brancos) de uma espécie hipotética. As linhas tracejadas separam os folículos primários (inferior) e secundários (superior) de acordo com valores pré-estabelecidos de 5 ou 10 mm. A linha pontilhada separa os folículos primários e secundários a partir da observação do aumento real dos folículos, no início de maio.

desenvolvimento influencia diretamente na sua duração. Tipicamente, temperaturas mais elevadas diminuem o período necessário para a conclusão do desenvolvimento (Andrews, 2004). Por exemplo, ovos da serpente *Phalotris lativittatus* incubados em 24°C requereram 119 dias de incubação ao passo que ovos mantidos em 28°C requereram 73 dias; uma diminuição

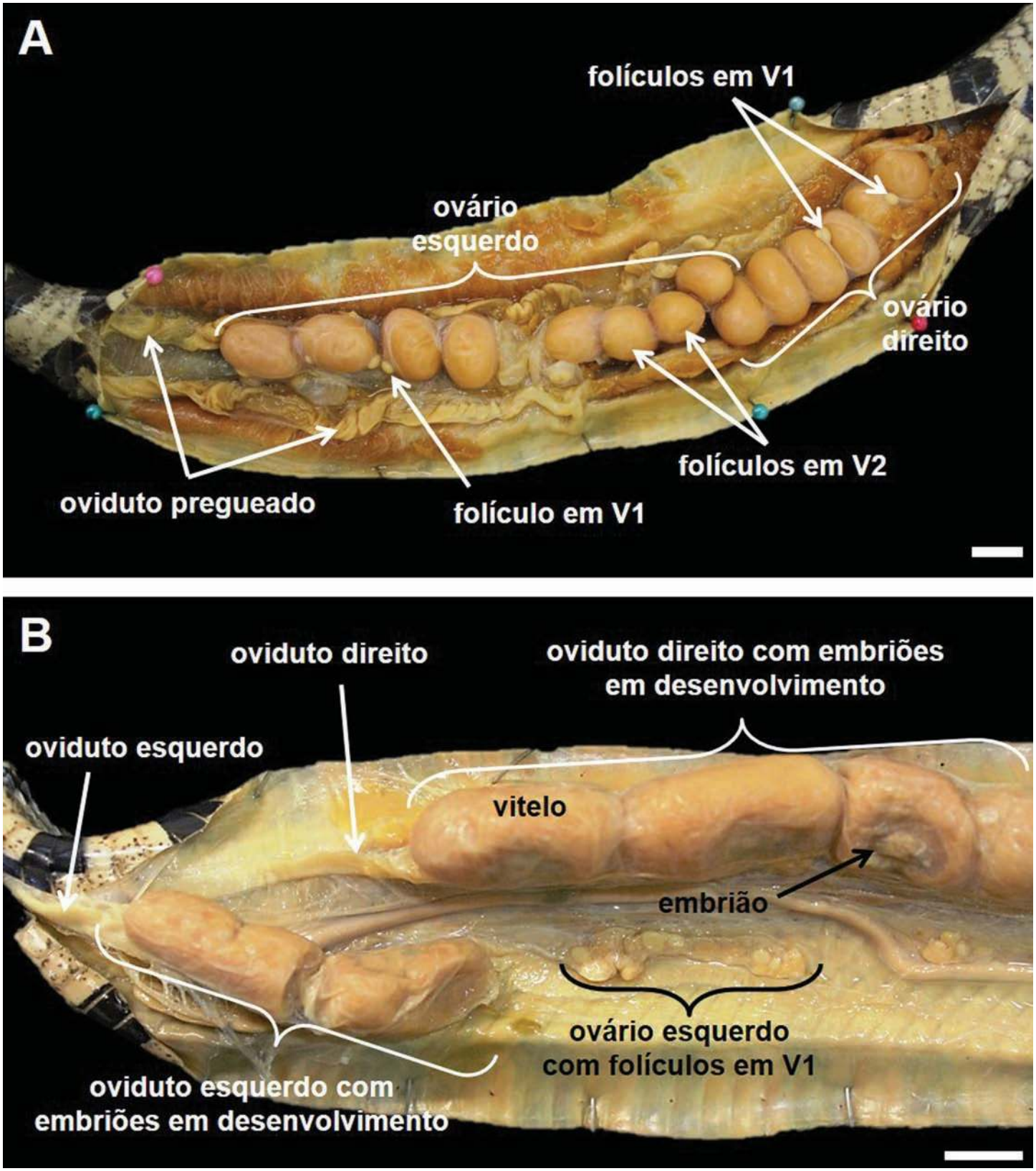


Figura 4: Fêmeas de serpentes (*Helicops* sp.) apresentando (A) folículos ovarianos em vitelogênese secundária e (B) embriões no oviduto. V1: Vitelogênese primária. V2: Vitelogênese secundária. Barra de escala = 1 cm. Fotos: Camilla M. de Carvalho.

de aproximadamente um mês e meio na duração da incubação (Braz *et* al., 2009). Essa relação é observada mesmo em táxons vivíparos. Apesar de fêmeas vivíparas poderem regular sua temperatura corpórea durante a gestação (Shine, 2012), a temperatura disponibilizada em laboratório para as mães durante esse período também influencia a duração do desenvolvimento (Ji *et* al., 2007). Contudo, essa informação é frequentemente negligenciada em diversos estudos (*e.g.,* Bizerra *et* al., 2005; Hauzman *et al.,* 2005). É de extrema importância que dados (média, amplitude) do ambiente térmico disponibilizado aos ovos ou às mães durante o estudo sejam monitorados e apresentados na publicação (*e.g.,* Travaglia-Cardoso e Albuquerque, 2006), possibilitando assim a contextualização da época de recrutamento no ciclo reprodutivo e facilitando a comparação dos resultados com outros estudos.

Em paralelo, o aspecto do oviduto é algumas vezes levado em consideração como indicativo de desova ou parturição recente. Alguns autores consideram a presença de oviduto com aspecto frouxo ou alargado como indicativo de condição pós-parto ou pós-desova (*e.g.,* Mesquita *et* al., 2013). No entanto, deve-se ressaltar que já durante a fase final de vitelogênese secundária os ovidutos começam a apresentar dobras, possivelmente preparando-se para o recebimento dos oócitos na ovulação. Sendo assim, a inferência de condição pós-parto com base na observação de pregas nos ovidutos deve ser feita com cautela, a partir de um bom conhecimento da anatomia da espécie estudada. Em paralelo, análises histológicas do útero glandular podem auxiliar nessa distinção. Na fase pré-ovulatória o útero apresenta diversas glândulas (envolvidas na formação da casca do ovo ou membrana da casca em vivíparos), ao passo que em fêmeas pós-parto tais glândulas encontram-se esvaziadas ou ausentes (Stewart *et* al., 2010). Além disso, pode-se considerar também a condição corpórea do animal. A presença de baixos níveis de gordura abdominal pode estar relacionada ao consumo dessa fonte energética ao longo dos eventos reprodutivos, especialmente a vitelogênese secundária e a gestação (Braña *et* al., 1992; Friggens, 2003; Schneider, 2004).

Machos

O ciclo reprodutivo dos machos apresenta vários componentes que devem ser estudados simultaneamente para se chegar a um consenso sobre como esse sistema funciona na espécie ou população de interesse. No estudo da atividade reprodutiva de machos de vertebrados, o exame dos testículos ocupa um lugar de destaque quando comparado aos ductos genitais (Romer e Parsons, 1986). O testículo das serpentes geralmente aumenta de tamanho durante a espermatogênese (Volsøe, 1944; Gribbins e Rheubert, 2011), de forma que medidas macroscópicas como tamanho e volume (Pleguezuelos e Feriche, 1999) são comumente utilizadas como indicador da atividade espermatogênica (Alves *et* al., 2005; Pizzatto, 2005; Pizzatto *et al.,* 2008; Leite *et al.,* 2009; López *et al.,* 2009; Scartozzoni *et al.,* 2009; Nunes *et al.,* 2010; Pinto *et al.,* 2010; Gomes e Marques, 2012; Bellini *et al.,* 2013). No entanto, trabalhos recentes que levaram em consideração técnicas histológicas têm mostrado que medidas macroscópicas podem não ser bons indicadores de atividade testicular para animais preservados em coleções zoológicas (Barros *et* al., 2012, 2014; Rojas *et al.,* 2013; Braz *et al.,* 2014). Fatores como compressão, desidratação e fixação inadequadas podem mudar o formato e tamanho da gônada resultando em conclusões equivocadas sobre a sazonalidade do ciclo reprodutivo. Por exemplo, uma análise do ciclo reprodutivo dos machos de dormideira (*Sibynomorphus mikanii*) utilizando somente o tamanho do testículo como indicador da época de espermatogênese concluiu que os machos desta espécie apresentavam ciclo reprodutivo contínuo por não haver variação desse parâmetro ao longo do ano (Pizzatto *et* al., 2008). No entanto, análises histológicas demonstraram mais tarde que o ciclo reprodutivo desta espécie é na verdade sazonal, havendo produção de espermatozoides durante apenas três meses por ano (Rojas *et* al., 2013). Resultados semelhantes têm sido encontrados para outras espécies (Barros *et* al., 2012, 2014; Braz *et al.,* 2014). Portanto, para estudar adequadamente o ciclo reprodutivo de machos de serpentes é indispensável o uso da histologia para caracterização do ciclo de desenvolvimento do epitélio seminal (Mathies, 2011). As análises microscópicas mais frequentemente utilizadas para tanto incluem o estudo dos estágios celulares (espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides) observados nos túbulos seminíferos ao longo do ano (Volsøe, 1944; Goldberg e Parker, 1975; Gribbins e Gist, 2003; Rojas *et* al., 2013) e avaliação de mudanças estruturais como diâmetro e altura do epitélio dos túbulos seminíferos (Rojas *et al.,* 2013). Cabe também ressaltar que o uso do termo "ciclo espermatogênico" é totalmente inadequado quando a abordagem abrange unicamente dados macroscópicos.

Após saírem dos túbulos seminíferos, os espermatozoides passam pela *rete testis,* dúctulos eferentes e ductos epididimários e adentram o ducto deferente (Volsøe, 1944; Sever, 2010; Trauth e Sever, 2011). Talvez por sua fácil observação e identificação anatômica, o ducto deferente é bastante estudado na determinação do ciclo reprodutivo de serpentes neotropicais (*e.g.,* Alves *et* al., 2005; Scartozzoni *et al.,* 2009; Sueiro *et al.,* 2010; Pinto *et al.,* 2010; Gomes e Marques, 2012). Diversos trabalhos têm mostrado que essa estrutura apresenta um aumento macroscópico de diâmetro em sua porção distal e sugerem que esse aumento esteja relacionado à estocagem de esperma (Almeida-Santos *et* al., 2004, 2006). No entanto, apenas por meio de cortes histológicos ou esfregaço é possível confirmar a presença de espermatozoides nesses ductos.

Em serpentes, o ducto deferente também pode apresentar uma estrutura conhecida como ampola, a qual tem um papel importante na estocagem de gametas (Sever, 2004; Siegel *et* al., 2009; Trauth e Sever, 2011). Em mamíferos, a ampola é relacionada à maturação, nutrição, estocagem e fagocitose de espermatozoides (Cooper e Hamilton, 1977; Bergerson *et* al., 1994). Contudo, poucos estudos abrangendo esse tópico foram realizados em serpentes (Sever, 2004; Siegel *et* al., 2009; Trauth e Sever, 2011). Outro ponto crítico no estudo do ducto deferente é a utilização unicamente da porção distal para aferir variações durante o ciclo reprodutivo, sendo que o estudo das porções cranial e medial podem também auxiliar na compreensão do processo de estocagem.

Em serpentes, assim como em outros Squamata, o rim (Fig. 2) desempenha uma função sexual secundária por meio do segmento sexual renal (SSR). Dependendo da espécie, esta estrutura é formada por uma região diferenciada dos túbulos contorcidos distais, ductos coletores e ureter (Saint Girons, 1972). Nos machos maduros, hipertrofia-se e torna-se secretora, sendo facilmente distinguível dos túbulos adjacentes em cortes histológicos. Sua atividade é andrógeno-dependente, e observa-se hipertrofia dessa região quando há aumento da concentração de testosterona na corrente sanguínea do animal. Na maioria dos ofídios, o aumento na atividade secretora do SSR está ligado à época de acasalamento (Volsøe, 1944; Bishop, 1959; Fox, 1977; Schuett *et* al., 2002). Assim, uma pesquisa morfofuncional sobre ciclo reprodutivo masculino em serpentes deve considerar a atividade secretora e estado de hipertrofia do SSR, que pode ser avaliada com base em medidas de diâmetro e de altura do epitélio dos túbulos néfricos que compõem essa estrutura (Rojas e Almeida-Santos, 2008; Rojas *et* al., 2013). Tais medidas, juntamente com análises de densidade e intensidade de coloração dos grânulos de secreção por técnicas histoquímicas, consistem nas variáveis mais frequentemente analisadas no estudo das variações sazonais do SSR (Aldridge e Brown, 1995; Krohmer *et* al., 2004). Colorações histoquímicas como Ácido Periódico de Schiff, Alcian Blue, Azul de Bromofenol e Sudan Black são utilizadas para determinar o tipo de secreção produzida pelo SSR (Kunhel e Krisch, 1974; Saint Girons, 1972; Sever e Hopkins, 2005; Sever *et* al., 2008; Rojas e Almeida-Santos, 2008; Rojas *et al.,* 2013), e a associação dessas técnicas às medidas microscópicas dos túbulos pode fornecer resultados mais precisos quanto à variação sazonal principalmente em relação aos grânulos secretados pelo SSR.

FECUNDIDADE

Tamanho da ninhada

Dados sobre o tamanho da ninhada (quantidade de ovos ou filhotes produzidos) certamente compõem a informação reprodutiva mais encontrada para serpentes (Fitch, 1970; Seigel e Ford, 1987). O tamanho da ninhada é facilmente obtido contando o número de ovos/embriões presentes no oviduto de diversas formas como: apalpação abdominal de fêmeas grávidas (Fitch, 1987), dissecção de exemplares (*e.g.,* Scartozzoni *et* al., 2009) ou observação do produto expelido (Gregory *et al.,* 1992). Além disso, é frequente encontrar na literatura estimativas do tamanho da ninhada feitas considerando também o número de folículos em vitelogênese secundária em fêmeas não grávidas (*e.g.,* Marques, 2001; Scartozzoni *et* al., 2009; Gomes e Marques, 2012). Quando da utilização de folículos secundários, poucos estudos deixam explícito a utilização desse tipo de dado (*e.g.,* Balestrin e Di-Bernardo, 2005; Oliveira *et* al., 2011; Mesquita *et al.,* 2013). Embora em algumas espécies o número de folículos secundários e o número de ovos/embriões seja similar (Maschio *et* al., 2007; Oliveira *et al.,* 2011), em outras o número de folículos secundários produzidos por uma fêmea é maior que o número de ovos/embriões observados no oviduto (Shine, 1977; Ford e Karges, 1987; Mesquita *et al.,* 2013). Assim, nem todos os folículos secundários produzidos são ovulados e convertidos em ovos/embriões, o que pode levar a estimativas equivocadas do tamanho da ninhada.

Diante disso, sugerimos que o tamanho da ninhada obtido pelo número de folículos secundários e pelo número de ovos/embriões no oviduto sejam considerados separadamente e comparados entre si (*e.g.,* Balestrin e Di-Bernardo, 2005; Oliveira *et al.,* 2011; Mesquita *et al.,* 2013). Além disso, recomendamos que folículos secundários sejam utilizados alternativamente apenas como estimativa do tamanho da ninhada nos casos em que o número de fêmeas grávidas na amostra é muito baixo ou inexistente. Nesses casos, a opção de utilizar fêmeas com folículos vitelogênicos em estágios bem avançados (em vez de folículos em todos os graus de vitelogênese) pode ser uma saída mais aconselhável para minimizar erros (*e.g.,* Braz *et* al., 2014).

Massa Relativa da Ninhada

A massa relativa da ninhada (*Relative Clutch Mass,* RCM) é uma estimativa operacional do investimento reprodutivo de uma determinada espécie (Bonnet *et* al., 2003). Outras maneiras de estimar o esforço reprodutivo podem ser encontradas na literatura (*e.g.,* Vitt e Congdon, 1978). Contudo, a massa relativa da ninhada (MRN) é a mais comumente utilizada, principalmente pela facilidade em se obter esse tipo de informação, sendo empregada em uma gama de estudos descrevendo padrões de investimento reprodutivo em Squamata (*e.g.,* Vitt e Congdon, 1978; Vitt e Price, 1982; Seigel e Fitch, 1984; Shine, 1988b, 1992; Shine e Schwarzkopf, 1992).

Duas formas de calcular a MRN são frequentemente encontradas na literatura: (1) massa total da ninhada/(massa da mãe após a desova ou parturição + massa total da ninhada) (Vitt e Congdon, 1978; Seigel e Fitch, 1984) e (2) massa total da ninhada/massa da mãe após desova ou parturição (Shine, 1980b). Apesar de alguns autores argumentarem que a segunda opção é mais adequada como estimativa do esforço reprodutivo, além de evitar problemas estatísticos (Shine, 1980b; Setser *et* al., 2010), tanto a primeira (Balestrin e Di-Bernardo, 2005; Oliveira *et al.,* 2011) quanto a segunda (Scartozzoni *et al.,* 2005; Pizzatto e Marques, 2006; Braz *et al.,* 2009) são recorrentemente observadas em estudos de reprodução. Alguns autores optam até mesmo por apresentar os valores calculados utilizando os dois modos (Braz e Almeida-Santos, 2008; Setser *et* al., 2010). Porém, os autores nem sempre deixam claro como a MRN foi calculada (*e.g.,* Costa *et* al., 2005; Hauzman *et al.,* 2005; Travaglia-Cardoso e Albuquerque, 2006), o que acaba dificultando a interpretação dos resultados pelo leitor, bem como comparações futuras. A despeito da opção por um ou outro método, é importante que a escolha do autor seja claramente explicitada no texto (*e.g.,* Scartozzoni *et* al., 2005; Oliveira *et al.,* 2011). Mais importante, nós encorajamos que os dois valores envolvidos no cálculo da MRN (*i.e.,* massa total da ninhada e massa da mãe após desova/parturição) sejam apresentados no texto (*e.g.,* Brown e Shine, 2002; Braz e Almeida-Santos, 2008). Assim, outros autores podem futuramente reaproveitar

ou reavaliar os dados em contextos comparativos (*e.g.,* Seigel e Fitch, 1984; Shine, 1992; Shine e Schwarzkopf, 1992). Além disso, algumas recomendações com relação à coleta desses dados são necessárias. Todo o produto reprodutivo expelido pelas mães deve ser pesado e incluído como massa da ninhada. Isso envolve ovos viáveis e inviáveis em táxons ovíparos e filhotes vivos, natimortos, vitelo e anexos embrionários nos táxons vivíparos (Gregory *et* al., 1992). Recomendações adicionais para a coleta de dados de MRN podem ser encontradas em Seigel e Ford (1987).

Produção de múltiplas ninhadas

A possibilidade de produção de mais de uma ninhada em uma única estação reprodutiva é uma característica que há tempos tem sido atribuída a fêmeas de serpentes que habitam regiões tropicais (Fitch, 1970, 1982; Seigel e Ford, 1987). No entanto, evidências diretas para essa suposição, ou seja, observação de duas ou mais desovas/parturições dentro de uma mesma estação reprodutiva por uma mesma fêmea, raramente têm sido demonstrada na natureza ou em espécimes recém-capturados (Seigel e Ford, 1987; Brown e Shine, 2002). A maior parte dos registros deriva de exemplares mantidos em cativeiro cujas condições estáveis (disponibilidade de alimento e temperatura constantes) podem modificar o potencial reprodutivo (Seigel e Ford, 1987). Na ausência de informações na natureza, muitos autores vêm utilizando o encontro de fêmeas contendo simultaneamente folículos vitelogênicos e ovos/embriões no oviduto como sugestão de que a espécie (ao menos potencialmente) se reproduz mais de uma vez em uma estação reprodutiva (*e.g.,* Vitt, 1983; Aguiar e Di-Bernardo, 2005; Marques e Muriel, 2007; Pinto *et* al., 2010; Mesquita *et al.,* 2013). Embora essa seja uma hipótese plausível, a natureza indireta dessa inferência a torna passível de interpretações alternativas. Outras possibilidades merecem ser consideradas paralelamente antes de se assumir a potencialidade de múltiplas ninhadas.

Antes de tudo, é preciso assegurar que os folículos ovarianos estejam de fato em vitelogênese (veja tópico sobre ciclos reprodutivos de fêmeas). Além disso, considerando que em algumas espécies o número de folículos secundários produzidos é maior que o número de oócitos efetivamente ovulados (conforme discutido no tópico sobre tamanho da ninhada), a presença de folículos secundários em fêmeas grávidas poderia, em vez de sugerir ninhadas múltiplas, representar tão somente folículos remanescentes, que mais tarde sofrerão processo de regressão ainda no ovário (Lourdais *et* al., 2003; Mathies *et al.,* 2004; García-Valdez *et al.,* 2011). Por exemplo, Shine (1977, p. 658) relata que, em alguns elapídeos, "um ou dois folículos que tinham atingido tamanho ovulatório não foram ovulados, tornaram-se atrésicos e começaram a regredir".

Pode-se argumentar que tais folículos remanescentes poderiam ser usados na produção de uma ninhada adicional. Contudo, os folículos são normalmente referidos apenas como "vitelogênicos" ou "aumentados", de forma que as medidas de tais folículos raramente são apresentadas. Nas poucas ocasiões em que dados quantitativos são apresentados (*e.g.,* Aguiar e Di-Bernardo, 2005; Pizzatto e Marques, 2006; Pinto *et* al., 2010) não é incomum notar que tais folículos ainda não atingiram tamanho pré-ovulatório. Em outras palavras, ainda carecem de deposição de vitelo para a produção de ninhada adicional. Nesse contexto, é importante ter em mente que a taxa de desenvolvimento folicular pode não ser constante ao longo do ano (veja discussão em Mathies, 2011).

Além disso, cabe ressaltar que a reprodução envolve custos (Shine, 2003), e entre a observação de uma fêmea grávida portando folículos secundários e a efetiva produção de uma ninhada adicional existe uma série de requisitos a serem considerados, como a necessidade de energia (adquirida prévia ou simultaneamente à reprodução, *capital breeders* vs. *income breeders;* Drent e Daan, 1980; Bonnet *et* al., 2002), preparação fisiológica, estocagem de esperma nas fêmeas ou cópula adicional, tempo para formação da casca do ovo e retenção dos ovos (de duas a quatro semanas; Andrews e Mathies, 2000). Dependendo da época em que for observada uma fêmea portando ovos/embriões no útero e folículos vitelogênicos, é provável que não haja tempo para a produção de outra ninhada na mesma estação. Por fim, características como o modo reprodutivo podem fornecer pistas contra a hipótese de múltiplas ninhadas. A viviparidade apresenta elevados custos associados à manutenção dos embriões (Shine, 1985; Bleu *et* al., 2012) e, de fato, a maior parte das espécies vivíparas se reproduz a intervalos de pelo menos dois anos (Seigel e Ford, 1987). Assim, a probabilidade de uma espécie vivípara produzir uma segunda ninhada em uma mesma estação reprodutiva (*e.g.,* Aguiar e Di-Bernardo, 2005) é bastante baixa.

Estudos monitorando populações naturais representam as melhores oportunidades de encontrarmos evidências de múltiplas ninhadas. Por exemplo, após monitorarem indivíduos de *Tropidonophis mairii* ao longo de 18 meses, Brown e Shine (2002) encontraram evidência inequívoca de produção de múltiplas ninhadas na natureza em uma única estação reprodutiva. Com base nisso, os autores propõem que a produção de múltiplas ninhadas seja bastante difundida em táxons tropicais, mas que a raridade de observações na natureza possivelmente reflita a falta de estudos monitorando a história reprodutiva de populações naturais (Brown e Shine, 2002). Nesse sentido, algumas espécies no Brasil sugeridas como produtoras de múltiplas ninhadas (*e.g., Liophis poecilogyrus:* Pinto e Fernandes, 2004; *Xenodon dorbignyi:* Oliveira *et* al., 2011) parecem ser bastante abundantes em determinadas áreas, uma vez que um grande número de indivíduos foram coletados em um período relativamente curto (Maciel *et al.,* 2003; Oliveira *et al.,* 2011), oferecendo imenso potencial para revelar outros exemplos inequívocos de produção de múltiplas ninhadas.

DIMORFISMO SEXUAL

Espécies de serpentes podem apresentar diferenças entre os sexos em diversas caraterísticas ecológicas e morfológicas (Shine, 1978b, 1994, Fitch, 1981, King, 1989, Vincent *et* al., 2004). O dimorfismo no tamanho do corpo e no tamanho da cauda estão entre os mais abordados em estudos de reprodução. A diferença intersexual no tamanho da cauda (tipicamente

maior em machos) é frequentemente associada à acomodação dos hemipênis e músculos retratores (King, 1989), embora a causa exata de sua evolução permaneça incerta (Shine *et* al., 1999). A análise do dimorfismo sexual no tamanho do corpo é especialmente importante pois pode fornecer pistas sobre o sistema de acasalamento da espécie como a presença de combate entre machos (Shine, 1978b, 1994).

Para comparações sobre o tamanho do corpo é utilizado o índice de dimorfismo sexual de tamanho (*Sexual Size Dimorphism,* SSD). Esse índice pode ser calculado com base em diferentes tipos de dados: (1) utilizando a média do comprimento rostro-cloacal (CRC) de machos e fêmeas, (2) considerando o tamanho corporal (CRC) máximo atingido por cada um dos sexos, (3) comparando o CRC com que machos e fêmeas atingem a maturidade sexual, ou até mesmo (4) comparando a massa corpórea, embora este último parâmetro esteja sujeito a flutuações em um curto espaço de tempo e seja raramente descrito em detalhe (Shine, 1994). Há ainda variadas fórmulas para o cálculo do índice de dimorfismo sexual propostas na literatura (veja revisão em Lovich e Gibbons, 1992). Considerando essa variedade, é importante deixar explícito no trabalho de que forma o SSD foi calculado. Assim, os dados poderão ser utilizados em diferentes contextos comparativos, como por exemplo, para a análise da evolução de sistemas de acasalamento, especialmente com respeito à comparação entre espécies que apresentam ou não ritual de combate entre machos (Shine, 1994). As análises abrangentes sobre este tema disponíveis na literatura não incluem uma amostragem significativa de espécies da região neotropical (Shine, 1978b, 1994), o que reforça a importância da apresentação dos dados utilizados no cálculo do SSD, para que uma análise comparativa englobando as espécies da região neotropical possa ser realizada no futuro.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O conhecimento sobre reprodução de serpentes neotropicais tem avançado bastante nos últimos vinte anos, especialmente no Brasil. Esse avanço, reconhecido inclusive internacionalmente (Mathies, 2011), resultou do esforço de diferentes pesquisadores espalhados pelo país e tem proporcionado conhecimento de aspectos reprodutivos básicos como ciclos reprodutivos, fecundidade e comportamento reprodutivo. Entretanto, as questões aqui abordadas destacam algumas inconsistências na execução de estudos em reprodução de serpentes que envolvem a identificação das estruturas anatômicas do trato reprodutor (fundamentais para a coleta de dados), a coleta e análise dos dados bem como a apresentação dos resultados. Isso posto, muitas oportunidades de estudos permanecem disponíveis em reprodução de serpentes.

As divergências entre análises macro e microscópicas no estudo da reprodução indicam que os ciclos reprodutivos de machos descritos apenas por caracterização macroscópica (diâmetro do ducto deferente, volume ou comprimento dos testículos) em diversas espécies carecem ainda de confirmação histológica. Tais análises podem ser realizadas tanto em parceria com laboratórios de histologia de universidades e institutos de pesquisa como em laboratórios comerciais privados. Estudos em campo monitorando populações naturais são necessários para a resolução de pontos relacionados não só à frequência reprodutiva abordados aqui, mas também para o esclarecimento de diversas questões relacionadas aos ciclos reprodutivos e à história de vida. Informações oriundas de cativeiro podem complementar dados obtidos em campo ou de animais preservados em coleção, especialmente aqueles difíceis de serem registrados na natureza, e fornecer informações comportamentais e fisiológicas que possibilitam a elucidação da dinâmica e evolução das estratégias reprodutivas. Por fim, cabe ressaltar a necessidade de buscarmos integrar os estudos em reprodução de machos e fêmeas de serpentes de modo que alcancemos uma maior compreensão da biologia reprodutiva da espécie em questão como um todo.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos a Hipócrates M. Chalkidis, Marcos A. Carvalho e Francisco L. Franco por permitir o exame dos espécimes aqui ilustrados e à Camilla M. de Carvalho e a Otavio A. V. Marques pelas fotografias. Agradecemos também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

Aguiar, L. F. S. e Di-Bernardo, M. 2005. Reproduction of the water snake *Helicops infrataeniatus* (Colubridae) in southern Brazil. *Amphibia-Reptilia,* 26: 527533.

Ahmadzadeh, F., Mebert, K., Ataei, S., Rezazadeh, E., Gholi, L. A. e Böhme, W. 2011. Ecological and biological comparison of three populations of the dice snake (*Natrix tessellata*) from the southern Caspian Sea coast, Iran. *Mertensiella,* 18: 403413.

Aldridge, R. D. 1979. Female reproductive cycles of the snakes *Arizona elegans* and *Crotalus viridis*. *Herpetologica,* 35: 256261.

Aldridge, R. D. 1992. Oviductal anatomy and seasonal sperm storage in the south-eastern crowned snake (*Tantilla coronata*). *Copeia,* 1992: 11031106.

Aldridge, R. D. e Brown, W. S. 1995. Male reproductive cycle, age at maturity, and cost of reproduction in the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*). *Journal of Herpetology,* 29: 399407.

Alencar, L. R. V., Galdino, C. A. B. e Nascimento, L. B. 2012. Life history aspects of *Oxyrhopus trigeminus* (Serpentes: Dipsadidae) from two sites in southeastern Brazil. *Journal of Herpetology,* 46: 913.

Almeida-Santos, S. M. e Salomão, M. G. 1997. Long-term sperm storage in the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). *Japanese Journal of Herpetology,* 17: 4652.

Almeida-Santos, S. M. e Salomão, M. G. 2002. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops;* pp. 445462. *In:* G. W. Schuett, M. Höggren, M. E. Douglas e H. W. Greene (Eds.), Biology of the Vipers. Eagle Mountain Publishing, Carmel.

Almeida-Santos, S. M., Laporta-Ferreira, I. L., Antoniazzi, M. M. e Jared, C. 2004. Sperm storage in males of the snake *Crotalus durissus terrificus* (Crotalinae: Viperidae) in southeastern Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology,* Part A, 139: 169174.

Almeida-Santos, S. M., Pizzatto, L. e Marques, O. A. V. 2006. Intra-sex synchrony and inter-sex coordination in the reproductive timing of the Atlantic coral snake *Micrurus corallinus* (Elapidae) in Brazil. *Herpetological Journal,* 16: 371376.

Alves, F. Q., Argolo, A. J. S. e Jim, J. 2005. Biologia reprodutiva de *Dipsas neivai* Amaral e *D. catesbyi* (Sentzen) (Serpentes, Colubridae) no sudeste da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia,* 22: 573579.

Andrews, R. M. 2004. Patterns of embryonic development; pp. 75102. *In:* D. C. Deeming (Ed.), Reptilian incubation – environment, evolution and behavior. Nottingham University Press, Nottingham.

Andrews, R. M. e Mathies, T. Natural history of reptilian development: constraints on the evolution of viviparity. *BioScience,* **50: 22**7238.

Ávila, R. W., Ferreira, V. L. e Arruda, J. A. O. 2006. Natural history of the South American water snake *Helicops leopardinus* (Colubridae: Hydropsini) in the Pantanal, Central Brazil. *Journal of Herpetology,* 40: 274279.

Ávila, R. W., Kawashita-Ribeiro, R. A., Ferreira, V. L. e Strüssmann, C. 2010. Natural history of the coral snake *Micrurus pyrrhocryptus* Cope 1862 (Elapidae) from semideciduous forests of western Brazil. *South American Journal of Herpetology,* 5: 97101.

Balestrin, R. L. e Di-Bernardo, M. 2005. Reproductive biology of *Atractus reticulatus* (Boulenger, 1885) (Serpentes, Colubridae) in Southern Brazil. *Herpetological Journal,* 15: 195199.

Barros, V. A., Rojas, C. A. e Almeida-Santos, S. M. 2014. Is rainfall seasonality important for reproductive strategies in viviparous Neotropical pit vipers? A case study with *Bothrops leucurus* from the Brazilian Atlantic Forest. *Herpetological Journal,* 24: 6977.

Barros, V. A., Sueiro, L. R. e Almeida-Santos, S. M. 2012. Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of phylogenetic conservatism of reproductive patterns. *Herpetological Journal,* 22: 97104.

Bellini, G. P., Arzamendia, V. e Giraudo, A. R. 2013. Ecology of *Thamnodynastes hypoconia* in subtropical-temperate South America. *Herpetologica,* 69: 6779.

Bergerson, W., Amselgruber, W., Sinowatz, F. e Bergerson, M. 1994. Morphological evidence of sperm maturation in the ampulla ductus deferentis of the bull. *Cell and Tissue Research,* 275: 537554.

Bishop, J. E. 1959. A histological and histochemical study of the kidney tubule of the common garter snake, *Thamnophis sirtalis,* with special reference to the sexual segment in the male. *Journal of Morphology,* 104: 307357.

Bizerra, A., Marques, O. A. V. e Sazima, I. 2005. Reproduction and feeding of the colubrid snake *Tomodon dorsatus* from south-eastern Brazil. *Amphibia-Reptilia,* 26: 3338.

Blackburn, D. G. 1998. Structure, function and evolution of the oviducts of squamate reptiles, with special reference to viviparity and placentation. *The Journal of Experimental Zoology,* 282: 560617.

Bleu, J., Heulin, B., Haussy, C., Meylan, S. e Massot, M. 2012. Experimental evidence of early costs of reproduction in conspecific viviparous and oviparous lizards. *Journal of Evolutionary Biology,* 25: 12641274.

Bonnet, X., Lourdais, O., Shine, R. e Naulleau, G. 2002. Reproduction in a typical capital breeder: costs, currencies, and complications in the aspic viper. *Ecology,* 83: 21242135.

Bonnet, X., Shine, R., Lourdais, O. e Naulleau, G. 2003. Measures of reproductive allometry are sensitive to sampling bias. *Functional Ecology,* 17: 3949.

Booth, W. e Schuett, G. W. 2011. Molecular genetic evidence for alternative reproductive strategies in North American pitvipers (Serpentes: Viperidae): long-term sperm storage and facultative parthenogenesis. *Biological Journal of Linnean Society,* 104: 934942.

Braña, F., Gonzalez, F. e Barahona, A. 1992 Relationship between ovarian and fat body weights during vitellogenesis for three species of lacertid lizards. *Journal of Herpetology,* 26: 515518.

Braz, H. B. e Almeida-Santos, S. M. 2008. *Dipsas indica* (Snail-eating snake): Reproduction. *Herpetological Bulletin,* 106: 3638.

Braz, H. B., Araujo, C. O. e Almeida-Santos, S. M. 2009. Life history traits of the snake *Phalotris lativittatus* (Xenodontinae: Elapomorphini) from the Brazilian Cerrado. *Herpetology Notes,* 2: 163164.

Braz, H. B., Kasperoviczus, K. N. e Almeida-Santos, S. M. 2014. Reproductive ecology and diet of the fossorial snake *Phalotris lativittatus* in the Brazilian Cerrado. *Herpetological Journal,* 24: 4957.

Brown, G. P. e Shine, R. 2002. Reproductive ecology of a tropical natricine snake, *Tropidonophis mairii* (Colubridae). *Journal of Zoology,* 258: 6372.

Cooper, T. G. e Hamilton, D. W. 1977. Phagocytosis of spermatozoa in the terminal region and gland of the vas deferens of the rat. *American Journal of Anatomy,* 150: 247268.

Costa, A. C. O. R., Hauzman, E. e Scartozzoni, R. R. 2005. *Chironius laevivollis* (Pale-necked whipsnake): Reproduction. *Herpetological Bulletin,* 92: 2627.

Cottone, A. M. e Bauer, A. M. 2009. Sexual size dimorphism, diet, and reproductive biology of the Afro-Asian Sand Snake, *Psammophis schokari* (Psammophiidae). *Amphibia-Reptilia,* 30: 331340.

Drent, R. H. e Daan, S. 1980. The prudent parent: energetic adjustments in avian breeding. *Ardea,* 68: 225252.

Fitch, H. S. 1970. Reproductive cycles in lizards and snakes. *Miscellaneous Publications of the Museum of Natural History University Kansas,* 52: 1247.

Fitch, H. S. 1981. Sexual size differences in reptiles. *Miscellaneous Publications of the Museum of Natural History University Kansas,* 70: 172.

Fitch, H. S. 1982. Reproductive cycles in tropical reptiles. *Occasional Papers of the Museum of Natural History, The Universtity of Kansas,* 96: 153.

Fitch, H. S. 1987. Collecting and life-history techniques; pp. 143164. *In:* R. A. Seigel, J. T. Collins e S. S. Novak (Eds.), Snakes: Ecology and Evolutionary Biology. McMillan, New York.

Ford, N. B. e Karges, J. P. 1987. Reproduction in the checkered garter snake, *Thamnophis marcianus,* from southern Texas and Northeastern Mexico: Seasonality and evidence for multiple clutches. *The Southwestern Naturalist,* 32: 93101.

Fox, H. 1977. The urogenital system of reptiles; pp. 1122. *In:* C. Gans (Ed.), Biology of the Reptilia, Volume 6. Academic Press, London.

Friggens, N. C. 2003. Body lipid reserves and the reproductive cycle: Towards a better understanding. *Livestock Production Science,* 83: 219226.

García-Valdez, M. V., Chamut, S., Valdez-Jaen, G., Arce, O. E. A. e Manes, M. E. 2011. Dynamics of ovarian follicles in *Tupinambis merianae* lizards. *Acta Herpetologica,* 6: 303313.

Girling, J. E. 2002. The reptilian oviduct: a review of structure and function and directions for future research. *Journal of Experimental Zoology,* 293: 141170.

Goldberg, S. R. e Parker, W. S. Seasonal testicular histology of the colubrid snakes, *Masticophis taeniatus* **and** *Pituophis melanoleucus*. *Herpetologica,* **31: 31**7322.

Gomes, C. A. e Marques, O. A. V. 2012. 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,* 7: 233240.

Gregory, P. T., Larsen, K. W. e Farr, D. R. 1992. Snake litter size = live young + dead young + yolks. *Herpetological Journal,* 2: 145146.

Gribbins, K. M. e Gist, D. H. 2003. The cytological evaluation of spermatogenesis within the germinal epithelium of the male European wall lizard, *Podarcis muralis*. *Journal of Morphology,* 258: 296306.

Gribbins, K. M. e Rheubert, J. M. 2011. The ophidian testis, spermatogenesis, and mature spermatozoa; pp. 183264. *In:* R. D. Aldridge e D. M. Sever (Eds.), Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes. Science Publishers, Enfield.

Hartmann, M. T., Del Grande, M. L., Gondim, M. J. C., Mendes, M. C. e Marques, O. A. V. 2002. Reproduction and activity of the snail-eating snake, *Dipsas albifrons* (Colubridae), in the Southern Atlantic Forest in Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment,* 37: 111114.

Hartmann, M. T., Marques, O. A. V. e Almeida-Santos, S. M. 2004. Reproductive biology of the Southern Brazilian pitviper *Bothrops neuwiedi pubescens* (Serpentes, Viperidae). *Amphibia-Reptilia,* 25: 7785.

Hauzman, E., Costa, A. C. O. R. e Scartozzoni, R. R. 2005. *Spilotes pullatus* (Tiger ratsnake). Reproduction. *Herpetological Review,* 36: 328.

Ji, X., Lin, C. X., Lin, L. H., Qiu, Q. B. e Du, Y. 2007. Evolution of viviparity in warm-climate lizards: an experimental test of the maternal manipulation hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology,* 20: 10371045.

Kasperoviczus, K. N. 2009. Biologia reprodutiva da jararaca ilhoa, *Bothrops insularis,* (Serpentes: Viperidae) da Ilha da Queimada Grande, São Paulo. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 124 pp.

Keogh, J. S., Branch, W. R. e Shine, R. 2000. Feeding ecology, reproduction and sexual dimorphism in the colubrid snake *Crotaphopeltis hotamboeia* in southern Africa. African *Journal of Herpetology,* 49: 129137.

King, R. 1989. Sexual dimorphism in snakes tail length: sexual selection, natural selection, or morphological constraint? *Biological Journal of the Linnean Society,* 38: 133154.

Krohmer, R. W., Martinez, D. e Mason, R. T. 2004. Development of the renal sexual segment in immature snakes: Effect of sex steroid hormones. *Comparative Biochemistry and Physiology,* 139: 5564.

Kuhnel, W. e Krisch, B. 1974. On the sexual segment of the kidney in the snake (*Natrix natrix*). *Cell and Tissue Research,* 148: 417429.

Leite, P. T., Nunes, S. F., Kaefer, I. L. e Cechin, S. Z. 2009. Reproductive biology of the swamp racer *Mastigodryas bifossatus* (Serpentes: Colubridae) in subtropical Brazil. *Zoologia,* 26: 1218.

López, M. S. e Giraudo, A. R. 2008. Ecology of the snake *Philodryas patagoniensis* (Serpentes, Colubridae) from Northeast Argentina. *Journal of Herpetology,* 42: 474480.

López, S. M., Giraudo, A. R., Arzamendia, V. e Chiaraviglio, M. 2009. Biología reproductiva de la serpiente semiacuática *Liophis semiaureus* (Serpentes, Colubridae) en el nordeste de Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural,* 82: 233244.

Lourdais, O., Bonnet, X., Shine, R. e Taylor, E. N. 2003. When does a reproducing female viper (*Vipera aspis*) 'decide' on her litter size? *Journal of Zoology,* 259: 123129.

Lovich, J. E. e Gibbons, J. W. 1992. A review of techniques for quantifying sexual size dimorphism. *Growth, Development & Aging,* 56: 269281.

Maciel, A. P., Di-Bernardo, M., Hartz, S. M., Oliveira, R. B. e Funk-Pontes, G. M. 2003. Seasonal and daily activity patterns of *Liophis poecilogyrus* (Serpentes: Colubridae) on the north coast of Rio Grande do Sul, Brazil. *Amphibia-Reptilia,* 24: 189200.

Marques, O. A. V. 1996. Reproduction, seasonal activity and growth of the coral snake, *Micrurus corallinus* (Elapidae), in the southeastern Atlantic forest in Brazil. *Amphibia-Reptilia,* 17: 277285.

Marques, O. A. V. 2001. *Sordellina punctata* (NCN) Reproduction. *Herpetological Review,* 32: 5152.

Marques, O. A. V. e Muriel, A. P. 2007. Reproductive biology and food habits of the swamp racer *Mastigodryas bifossatus* from southeastern South America. *Herpetological Journal,* 17: 104109.

Marques, O. A. V. e Puorto, G. 1998. Feeding, reproduction and growth in the crowned snake *Tantilla melanocephala* (Colubridae), from southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia,* 19: 311318.

Marques, O. A. V., Kasperoviczus, K. N. e Almeida-Santos, S. M. 2013. Reproductive ecology of the threatened pitviper *Bothrops insularis* from Queimada Grande Island, southeast Brazil. *Journal of Herpetology,* 47: 393399.

Maschio, G. F., Prudente, A. L. C., Lima, A. C. e Feitosa, D. T. 2007. Reproductive biology of *Anilius scytale* (Linnaeus, 1758) (Serpentes, Aniliidae) from eastern Amazonia, Brazil. *South American Journal of Herpetology,* 2: 179183.

Mathies, T. 2011. Reproductive cycles of tropical snakes; pp. 511550. *In:* R. D. Aldridge e D. M. Sever (Eds.), Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes. Science Publishers, Enfield.

Mathies, T., Franklin, E. A. e Miller, L. A. 2004. Proximate cues for ovarian recrudescence and ovulation in the brown treesnake (*Boiga irregularis*) under laboratory conditions. *Herpetological Review,* 35: 4649.

Mesquita, P. C. M. D., Borges-Nojosa, D. M., Passos, D. C. e Bezerra, C. H. 2011. Ecology of *Philodryas nattereri* in the Brazilian semi-arid region. *Herpetological Journal,* 21: 193198.

Mesquita, P. C. M. D., Sá-Polidoro, G. L. e Cechin, S. Z. 2013. Reproductive biology of *Philodryas olfersii* (Serpentes, Dipsadidae) in a subtropical region of Brazil. *Herpetological Journal,* 23: 3944.

Nunes, S. F., Kaefer, I. L., Leite, P. T. e Cechin, S. Z. 2010. Reproductive and feeding biology of the pitviper *Rhinocerophis alternatus* from subtropical Brazil. *Herpetological Journal,* 20: 3139.

Oliveira, R. B., Funk-Pontes, G. M., Maciel, A. P., Gomes, L. R. e Di-Bernardo, M. 2011. Reproduction of *Xenodon dorbignyi* on the north coast of Rio Grande do Sul, Brazil. *Herpetological Journal,* 21: 219225.

Orofino, R. P., Pizzatto, L. e Marques, O. A. V. 2010. Reproductive biology and food habits of *Pseudoboa nigra* (Serpentes: Dipsadidae) from the Brazilian Cerrado. *Phyllomedusa,* 9: 5361.

Panzera, A. e Maneyro, R. 2013. Reproductive biology of the snake *Liophis anomalus* (Günther, 1858, Dipsadidae, Xenodontinae). *Herpetological Journal,* 23: 8187.

Pinto, R. R. e Fernandes, R. 2004. Reproductive biology and diet of *Liophis poecilogyrus poecilogyrus* (Serpentes, Colubridae) from southeastern Brazil. *Phyllomedusa,* 3: 914.

Pinto, R. R., Marques, O. A. V. e Fernandes, R. 2010. Reproductive biology of two sympatric colubrid snakes, *Chironius flavolineatus* and *Chironius quadricarinatus,* from the Brazilian Cerrado domain. *Amphibia-Reptilia,* 31: 463473.

Pizzatto, L. 2005. Body size, reproductive biology and abundance of the rare pseudoboini snakes genera *Clelia* and *Boiruna* (Serpentes, Colubridae) in Brazil. *Phyllomedusa,* 4: 111122.

Pizzatto, L. e Marques, O. A. V. 2002. Reproductive biology of the false coral snake *Oxyrhopus guibei* (Colubridae) from southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia,* 23: 495504.

Pizzatto, L. e Marques, O. A. V. 2006. Interpopulational variation in sexual dimorphism, reproductive output, and parasitism of *Liophis miliaris* (Colubridae) in the Atlantic forest of Brazil. *Amphibia-Reptilia,* 27: 3746.

Pizzatto, L., Cantor, M., Oliveira, J. L., Marques, O. A. V., Capovilla, V. e Martins, M. 2008. Reproductive ecology of dipsadine snakes, with emphasis on south american species. *Herpetologica,* 64: 168179.

Pleguezuelos, J. M. e Feriche, M. 1999. Reproductive ecology of the horseshoe whip snake, *Coluber hippocrepis,* in the southeast of the Iberian Peninsula. *Journal of Herpetology,* 33: 202207.

Rojas, C. A. 2013. Padrões de estocagem de esperma e variações cíclicas ovidutais em serpentes Xenodontinae. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 173 p.

Rojas, C. A. e Almeida-Santos, S. M. 2008. Influência do ciclo do segmento sexual renal na determinação do acasalamento em *Sibynomorphus mikanii* (dormideira). *Pesquisa Veterinária Brasileira,* 28: 154156.

Rojas, C. A., Barros, V. A. e Almeida-Santos, S. M. 2013. The reproductive cycle of the male sleep snake *Sibynomorphus mikanii* (Schlegel, 1837) from southeastern Brazil. *Journal of Morphology,* 274: 215228.

Romer, A. S. e Parsons, T. S. 1986. The vertebrate body. Saunders College Publishing, New York, 656 pp.

Saint Girons, H. 1972. Morphologie comparée du segment sexuel du rein des squamates (Reptilia). *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale,* 61: 243266.

Saint Girons, H. 1985. Comparative data on Lepidosaurian reproduction and some time tables; pp. 3558. *In:* C. Gans e F. Billett (Eds.), Biology of the Reptilia, Volume 15. John Wiley e Sons, New York.

Santos, L. C. 2009. Biologia reprodutiva de *Leposternon microcephalum* (Squamata, Amphisbaenidae) do Sudeste do Brasil. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 126 pp.

Scartozzoni, R. R., Almeida-Santos, S. M. e Salomão, M. G. 2005. Aspectos da reprodução da cobra bicuda *Oxybelis fulgidus* (Serpentes: Colubridae). *Publicações Avulsas do Instituto Pau Brasil,* 89: 8590.

Scartozzoni, R. R., Salomão, M. G. e Almeida-Santos, S. M. 2009. Natural history of the vine snake *Oxybelis fulgidus* (Serpentes, Colubridae) from Brazil. *South American Journal of Herpetology,* 4: 8189.

Schneider, J. E. 2004. Energy balance and reproduction. *Physiology and Behavior,* 81: 289317.

Schuett, G. W., Carlisle, S. L., Holycross, A. T., O'Leile, J. K., Hardy, D. L., Van Kirk, E. A. e Murdoch, W. J. 2002. Mating system of male Mojave rattlesnakes (*Crotalus scutulatus*): Seasonal timing of mating, agonistic behavior, spermatogenesis, sexual segment of the kidney, and plasma sex steroids; pp. 515532. *In:* G. W. Schuett, M. Höggren, M. E. Douglas e H. W. Greene (Eds.), Biology of the Vipers. Eagle Mountain, Carmel.

Seigel, R. A. e Fitch, H. S. 1984. Ecological patterns of relative clutch mass in snakes. *Oecologia,* 61: 293301.

Seigel, R. A. e Ford, N. B. 1987. Reproductive ecology, pp. 210252. *In:* R. A. Seigel, J. T. Collins e S. S. Novak (Eds.), Snakes: Ecology and Evolutionary Biology. McMillan, New York.

Setser, K., Mociño-Deloya, E., Pleguezuelos, J. M., Lazcano, D. e Kardon, A. 2010. Reproductive ecology of female mexican lance-headed rattlesnakes. *Journal of Zoology,* 281: 175182.

Sever, D. M. 2004. Ultrastucture of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). IV. Occurrence of an ampulla ductus deferentis. *Journal of Morphology,* 262: 714730.

Sever, D. M. 2010. Ultrastucture of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). VI. Anterior testicular ducts and their nomenclature. *Journal of Morphology,* 271: 104115.

Sever, D. M. e Hopkins, W. A. 2005. Renal sexual segment of the ground skink, *Scincella laterale* (Reptilia, Squamata, Scincidae). *Journal of Morphology,* 266: 4659.

Sever, D. M., Siegel, D. S., Bagwill, A., Eckstut, E. M., Alexander, L., Camus, A. e Morgan, C. 2008. Renal sexual segment of the cottonmouth snake *Agkistrodon piscivorus* (Reptilia, Squamata, Viperidae). *Journal of Morphology,* 269: 640653.

Shine, R. 1977. Reproduction in Australian elapid snakes. Australian *Journal of Zoology,* 25: 655666.

Shine, R. 1978a. Growth rates and sexual maturation in six species of Australian elapid snakes. *Herpetologica,* 34: 7379.

Shine, R. 1978b. Sexual size dimorphism and male combat in snakes. *Oecologia,* 33, 269278.
Shine, R. 1980a. Comparative ecology of three Australian snake species of the genus *Cacophis* (Serpentes: Elapidae). *Copeia,* 1980: 831838.
Shine, R. 1980b. "Costs" of reproduction in reptiles. *Oecologia,* 46: 92100.
Shine, R. 1985. The evolution of viviparity in reptiles: an ecological analysis; pp. 605694. *In:* C. Gans e F. Billett (Eds.), Biology of the Reptilia, Volume 15. John Wiley e Sons, New York.
Shine, R. 1988a. Food habits and reproductive biology of small Australian snakes of the genera *Unechis* and *Suta* (Elapidae). *Journal of Herpetology,* 22: 307315.
Shine, R. 1988b. Constraints on reproductive investment: a comparison between aquatic and terrestrial snakes. *Evolution,* 42: 1727.
Shine, R. 1992. Relative clutch mass and body shape in lizards and snakes: Is reproductive investment constrained or optimized? *Evolution,* 46: 828833.
Shine, R. 1994. Sexual size dimorphism in snakes revisited. *Copeia,* 1994, 325346.
Shine, R. 2003. Reproductive strategies in snakes. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences,* 270: 9951004.
Shine, R. 2012. Manipulative mothers and selective forces: The effects of reproduction on thermoregulation in reptiles. *Herpetologica,* 68: 289298.
Shine, R. e Bonnet, X. 2009. Reproductive biology, population viability, and options for field management; pp. 172200. *In:* S. J. Mullin e R. A. Seigel (Eds.), Snakes – Ecology and Conservation. Cornell University Press, Ithaca.
Shine, R. e Covacevich, J. 1983. Ecology of highly venomous snakes: the Australian genus *Oxyuranus* (Elapidae). *Journal of Herpetology,* 17: 6069.
Shine, R. e Schwarzkopf, L. 1992. The evolution of reproductive effort in lizards and snakes. Evolution, 46: 6275.
Shine, R., Haagner, G. V., Branch, W. R., Harlow, P. S. e Webb, J. K. 1996. Natural history of the African shieldnose snake *Aspidelaps scutatus* (Serpentes, Elapidae). *Journal of Herpetology,* 30: 361366.
Shine, R., Olsson, M. M., Moore, I. T., LeMaster, M. P. e Mason, R. T. 1999. Why do male snakes have longer tails than females? *Proceedings of the Royal Society of London,* 266: 21472151.
Siegel, D. S., Miralles, A., Chabarria, R. E. e Aldridge, R. D. 2011. Female reproductive anatomy: cloaca, oviduct and sperm storage; pp. 347409. *In:* R. D. Aldridge e D. M. Sever (Eds.), Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes. Science Publishers, Enfield.
Siegel, D. S., Sever, D. M., Rheubert, J. L. e Gribbins, K. M. 2009. Reproductive biology of *Agkistrodon piscivorus* Lacepede (Squamata, Serpentes, Viperidae, Crotalinae). *Herpetological Monographs,* 23: 74107.
Silva, K. M. P., Sueiro, L. R. e Almeida-Santos, S. M. 2014. Reprodução de *Bothrops* spp. (Serpentes, Viperidae) em criadouro conservacionista. Veterinária e Zootecnia (UNESP), no prelo.
Siqueira, D. M., Nascimento, L. P., Montingelli, G. e Santos-Costa, M. C. 2013. Geographical variation in the reproduction and sexual dimorphism of the Boddaert's tropical racer, *Mastigodryas boddaerti* (Serpentes: Colubridae). *Zoologia,* 30: 475481.
Sousa, K. R. M., Prudente, A. L. C. e Maschio, G. F. 2014. Reproduction and diet of *Imantodes cenchoa* (Dipsadidae: Dipsadinae) from the Brazilian Amazon. *Zoologia,* 31: 819.
Stewart, J. R., Mathieson, A. N., Ecay, T. W., Herbert, J. F., Parker, S. L. e Thompson, M. B. 2010. Uterine and eggshell structure and histochemistry in a lizard with prolonged uterine egg retention (Lacertilia, Scincidae, *Saiphos*). *Journal of Morphology,* 271: 13421351.
Sueiro, L. R., Almeida-Santos, S. M., França, F. O. S., Risk, J. Y. e Rojas, C. A. 2010. Anomalias cromáticas em *Bothrops jararaca* (Serpentes Viperidae): Xantismo interfere na sobrevivência? *Biotemas,* 23: 155160.
Trauth, S. E. e Sever, D. M. 2011. Male urogenital ducts and cloacal anatomy; pp. 183264. *In:* R. D. Aldridge e D. M. Sever (Eds.), Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes. Science Publishers, Enfield.
Travaglia-Cardoso, S. R. e Albuquerque, C. C. 2006. *Tropidodryas striaticeps* (Vine-snake): Reproduction. *Herpetological Bulletin,* 98: 3435.
Vincent, S. E., Herren, A. e Irschick, D. J. 2004. Sexual dimorphism in head shape and diet in the cottonmouth snake (*Agkistrodon piscivorus*). *Journal of Zoology,* 264: 5359.
Vitt, L. J. 1983. Ecology of an anuran-eating guild of terrestrial tropical snakes. *Herpetologica,* 39: 5266.
Vitt, L. J. e Congdon, J. D. 1978. Body shape, reproductive effort, and relative clutch mass in lizards: Resolution of a paradox. *The American Naturalist,* 112: 595608.
Vitt, L. J. e Price, H. J. 1982. Ecological and evolutionary determinants of relative clutch mass in lizards. *Herpetologica,* 38: 237255.
Volsøe, H. 1944. Structure and seasonal variation of the male reproductive organs of *Vipera berus* (L.). *Spolia Zoologica Musei Hauniensis,* 5: 1157.
Zanella, N. e Cechin, S. Z. 2010. Reproductive biology of *Echinanthera cyanopleura* (Serpentes: Dipsadidae) in southern Brazil. *Zoologia,* 27: 3034.



Phyllomedusa vaillanti, FLONA Pau-Rosa, AM. Foto: Pedro Peloso.