

**CICLO REPRODUCTIVO DE SERPIENTES MACHO *Atractus* sp nov
(SERPENTES: COLUBRIDAE) DEL ORIENTE COLOMBIANO**

LUIS EDUARDO GUALDRÓN DURÁN

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2016

**CICLO REPRODUCTIVO DE SERPIENTES MACHO *Atractus* sp nov
(SERPENTES: COLUBRIDAE) DEL ORIENTE COLOMBIANO**

LUIS EDUARDO GUALDRÓN DURÁN

Trabajo de Grado para optar al título de Biólogo

DIRECTOR

MARTHA PATRICIA RAMÍREZ PINILLA

Ph. D.

TUTOR

EZEQUIEL GONZÁLEZ LEÓN

Biólogo

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2016

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Martha Patricia Ramírez por permitirme ser parte del grupo de investigación, por la dedicación prestada y la formación que recibí durante la ejecución del proyecto.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biología de Vertebrados, por cada momento vivido, por las sugerencias aportadas durante el proyecto y por permitirme aprender de cada uno de ellos.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a Dios, mi padre y fiel amigo. A mi madre Olga Lucía Durán, mi hermana Laura Lucía y demás miembros de mi familia, por apoyarme durante tantos años y creer que todo puede ser posible. A Yessica Brigith Caballero, mi novia, confidente e inseparable amiga que siempre ha creído en mis capacidades y con sus consejos he podido tomar buenas decisiones.

COMPETENCIAS DE LA PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN

1. Implementar la metodología de campo necesaria para la captura exitosa de serpientes.
2. Utilizar técnicas adecuadas para la muerte, fijación y preservación de los individuos colectados.
3. Reconocer los caracteres morfológicos propios de *Atractus* sp. que permitan distinguir externamente entre machos y hembras.
4. Identificar y describir características macroscópicas y microscópicas del tracto reproductivo de las serpientes macho denotando las diferencias entre juveniles y adultos.
5. Realizar cortes histológicos del tracto reproductivo derecho (testículo, ducto deferente y riñón) permitiendo determinar el estado reproductivo de cada individuo.
6. Describir los estados reproductivos de los machos mediante el análisis de la espermatogénesis y su variación en el tiempo para determinar la actividad reproductiva anual.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN.....	12
1. OBJETIVOS	14
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1 ZONA DE ESTUDIO	15
2.2 MUESTREO.....	15
2.3 ANÁLISIS MACROSCÓPICOS	15
2.4 PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	16
2.5 ANÁLISIS MICROSCÓPICOS.....	16
2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	17
3. RESULTADOS	19
3.1 Descripción macroscópica del tracto reproductivo de los machos de <i>Atractus</i> sp.	19
3.2 Descripción microscópica.....	19
3.2.1 Ciclo espermatogénico de <i>Atractus</i> sp.	19
3.2.2 Segmento sexual del riñón de <i>Atractus</i> sp.....	20
3.2.3 Ductos deferentes distales de <i>Atractus</i> sp.....	20
3.2.4 Histoquímica del SSK y ductos deferentes distales de <i>Atractus</i> sp.....	21
3.3 Estructura poblacional de <i>Atractus</i> sp.....	22
3.4 Variación morfométrica de <i>Atractus</i> sp.....	22
4. DISCUSIÓN.....	24
BIBLIOGRAFÍA.....	29
ANEXOS	37

LEYENDA DE FIGURAS 37

FIGURA 1..... 39

FIGURA 3..... 41

FIGURA 4..... 42

FIGURA 5..... 43

FIGURA 6..... 44

FIGURA 7..... 45

RESUMEN

TÍTULO: CICLO REPRODUCTIVO DE SERPIENTES MACHO *Atractus* sp nov (SERPENTES: COLUBRIDAE) DEL ORIENTE COLOMBIANO¹

AUTOR: Gualdrón Durán, Luis Eduardo²

PALABRAS CLAVES: Ampolla deferente, *Atractus* sp, ciclo espermatogénico, madurez sexual, segmento sexual del riñón (Ssk), testículo.

DESCRIPCIÓN: Se estudió la actividad reproductiva anual de serpientes macho *Atractus* sp, describiendo aspectos macroscópicos e histológicos de los tractos reproductivos en individuos juveniles y adultos colectados durante un año. La anatomía macroscópica es en general similar a la reportada en otras especies tropicales. *Atractus* sp presenta ampolla del ducto deferente, similar a lo reportado en otras especies. El segmento sexual del riñón de los especímenes adultos mostró gran densidad de gránulos citoplasmáticos positivos a la reacción de PAS indicando la presencia de carbohidratos neutros y actividad secretora continua. El mismo órgano en los individuos juveniles fue débilmente positivo a la reacción de PAS y sin evidencia de actividad secretora en el epitelio luminal. Los individuos juveniles fueron clasificados en el estado de espermiogénesis temprana, con predominancia de espermatoцитos secundarios y espermátides en metamorfosis en el interior de los túbulos seminíferos. Todos los individuos adultos estuvieron en espermiogénesis, los especímenes de todo el año de estudio presentaron espermatozoides maduros en el lumen de los túbulos seminíferos, epidídimo y conductos excurrentes. El tamaño de madurez sexual para los machos es de 137 mm LRC (longitud rostro – cloaca). A pesar del régimen bimodal de precipitación en la zona de estudio, los machos de la población de *Atractus* sp tienen una actividad reproductiva continua acíclica sin variación en la actividad gonadal anual, constituyéndose así en un recurso permanente para las hembras y la reproducción de la especie.

1. Trabajo de Grado.

2. Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Directora: Martha Patricia Ramírez Pinilla; Tutor: Ezequiel González León.

ABSTRACT

TITLE: THE REPRODUCTIVE CYCLE OF MALE SNAKE *ATRACTUS* SP NOV (SERPENTE: COLUBRIDAE) FROM EASTERN COLOMBIAN¹

AUTHOR: GUALDRÓN DURÁN, Luis Eduardo²

KEY WORDS: Ampulla ductus deferentis, *Atractus* sp, spermatogenic cycle, sexual maturity, segment sexual of the kidney (ssk), testis.

DESCRIPTION: We studied the annual reproductive activity of male snake *Atractus* sp, describing macroscopic and histological aspects of the reproductive tracts in juveniles and mature males collected throughout the year. Macroscopic anatomy was similar in general to others tropical snakes species. *Atractus* sp showed ampulla ductus deferentis being similar to reports in other species. The sexual segment of the kidney of adults specimens showed maximum density of positive reaction cytoplasmic granules to PAS, which indicate presence of neutral carbohydrates and continuous secretory activity. The same structure in juveniles individuals was positive weakly reaction to PAS without evidence of secretor activity in the inner of luminal epithelium. Juvenile specimens were classified in early spermiogenesis stage with prevalence of secondary spermatocytes and spermatids in metamorphosis in the inner walls of the seminiferous tubules. All mature individuals were classified in spermiogenesis with presence of spermatozoa in the lumen of seminiferous tubules, epididymis and sexual ducts. The minimum size at sexual maturity was 137 mm SVL (snout vent length). Although the zone presents a bimodal rainfall regime, the *Atractus* sp population has acyclical continuous reproductive activity without variation in the annual gonadal activity, constituting thus a permanent recourse for the females and the reproduction of the specie.

1 Degree work

2 Science faculty, Department of Biology. Director: Martha Patricia Ramírez Pinilla, Ph.D. and Tutor: Ezequiel González León

INTRODUCCIÓN

Las serpientes presentan gran flexibilidad en sus tácticas reproductivas, respecto a la estacionalidad y sincronía intersexos generalmente asociadas a factores ambientales o vinculados a su historia filogenética (Shine, 2003; Pizzato et al., 2008a). Se han encontrado machos altamente estacionales en las zonas templadas cuya producción de esperma está restringida a breves períodos de tiempo, justo antes del período ovulatorio de las hembras (Saint Girons, 1982), reservada a los meses más cálidos (Seigel & Ford, 1987) e incluso machos adultos que podrían no participar en la actividad reproductiva durante algunos años (Weatherhead & Boag, 1995). Algunos estudios señalan que típicamente los machos de las regiones tropicales se reproducen todo el año, alcanzando el estado de madurez antes que las hembras (Seigel, 1987).

La mayor parte de los estudios reproductivos de serpientes se han enfocado en especies de zonas templadas (Norteamérica y Europa), siendo predominante el patrón reproductivo estacional, posiblemente debido a las condiciones climáticas de estas zonas (Krohmer et al., 1987; Shine, 1993; Barron & Andraso, 2001;; Schuett et al., 2002; Siegel et al., 2009; Barros et al., 2012). Sin embargo, en zonas tropicales, a pesar de la gran diversidad de serpientes aún se desconoce la biología reproductiva de la mayoría de las especies (Pizzatto & Marques, 2002; Pizzato et al., 2008b). Los primeros estudios señalan que la mayoría de serpientes tropicales se reproducen continuamente (Fitch, 1970, 1972). Sin embargo, análisis más recientes demostraron que los patrones reproductivos varían claramente desde estacional estricto (Shine, 1991; Marques, 1996a), ampliamente estacional (Fowler et al., 1998) y continuo (Pizzatto & Marques, 2002). Además, los ciclos continuos pueden presentar picos reproductivos (Pizzato et al., 2008), posiblemente por la amplia variación climática que determina la fenología reproductiva de las serpientes (Pizzatto & Marques, 2006a).

La mayoría de estudios en serpientes neotropicales se han realizado en hembras (Almeida-Santos & Saloma, 2002; Barros et al., 2012; Resende & Nascimento, 2014), aun cuando los patrones reproductivos suelen ser diferenciales entre sexos (Scartozzoni et al., 2009; Orofino et al., 2010). Además, la mayor parte de los trabajos en los que se estudian también los machos no incluyen análisis microscópicos (Pizzatto & Marques, 2007; Pizzatto et al., 2008a,b; Scartozzoni et al., 2009; Pinto et al., 2010; Orofino et al., 2010). A menudo, los testículos y ductos accesorios son examinados macroscópicamente, determinando madurez pero no condición testicular, pudiéndose generar conclusiones poco soportadas (Mathies,

2011). Por otra parte, pocos estudios involucran el segmento sexual del riñón (SSK, sexual segment of the kidney, siglas en inglés), que constituye una estructura sexual dependiente de andrógenos localizada en la porción anterior del riñón (Bishop, 1959). Algunos estudios señalan que la hipertrofia y recrudescencia del SSK es sincrónico con la secreción de andrógenos y la actividad espermatogénica (Sever & Hopkins, 2005), indicando relación directa con el período reproductivo (Volsøe, 1944; Bishop, 1959; Schuett et al., 2002; Graham, 2006; Aldridge et al., 2011; Rojas et al., 2013)

El género *Atractus* comprende serpientes fosoriales ampliamente distribuidas en Centro y Sur América, desde el Occidente de Panamá hasta el Norte de Argentina (Giraudó, 2001; Marques et al., 2001). Estudios previos en ocho especies del género *Atractus* en Brasil (Martins & Oliveira, 1993; 1998) indicaron reproducción estacional en seis de éstas (*A. alphonsehoguei*, *A. major*, *A. poeppigi*, *A. schach*, *A. snethlageae* y *A. trilineatus*), mientras que las dos restantes presentaron reproducción continua (*A. latifrons* y *A. torquatus*). Además, análisis más recientes en *Atractus reticulatus* y *Atractus pantostictus* del sur de Brasil (Balestrin & Di-Bernardo, 2005; Cassimiro et al., 2002, respectivamente) mostraron que las poblaciones estudiadas presentan un ciclo reproductivo estacional, restringido a los meses cálidos (Septiembre – Marzo), cuando los machos alcanzan la madurez sexual a los 8 a 10 meses de edad y las hembras entre 11 y 12 meses.

La población de *Atractus* sp. objeto del presente estudio es una especie en proceso de descripción y cuya biología reproductiva se desconoce. Este estudio hace parte de un macroproyecto mayor cuyo objetivo es la descripción de la especie y el estudio de su biología reproductiva, además del registro de otros aspectos de su historia natural. En este estudio se describe la actividad reproductiva anual de los machos de esta población evaluando la variación mensual de los estados reproductivos, tamaño de madurez sexual y la relación entre la actividad gonadal y el patrón climático del área de estudio definido por la precipitación.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad reproductiva anual de la serpiente macho *Atractus* sp.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir la morfología macroscópica y microscópica del tracto reproductivo, determinando el tamaño en el que se alcanza la madurez sexual.
- Relacionar la morfología y morfometría del tracto reproductivo de los machos con el tiempo y las condiciones ambientales para determinar si existe o no estacionalidad y sincronía en la actividad reproductiva de esta población.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ZONA DE ESTUDIO

El estudio se realizó en La Hacienda Esparta localizada en el municipio de Santa Bárbara, Santander (7,01360689 N -72,89739443 W; altitud 2200 m) en la Cordillera Oriental de los Andes colombianos. La zona presenta un régimen de precipitación bimodal tetraestacional con dos picos de lluvias (abril – mayo y octubre – noviembre) y dos períodos secos (diciembre – marzo y junio - septiembre), con una temperatura media de 18°C (Alcaldía de Santa Bárbara, Santander).

2.2 MUESTREO

Con el fin de obtener serpientes macho del género *Atractus* sp. se realizó una salida mensual (marzo - septiembre) al municipio de Santa Bárbara, Santander. Los especímenes fueron colectados por captura manual mediante el levantamiento de rocas debido al hábito semifosorial de la especie. Se colectaron al menos 4 individuos mensualmente usando como criterio de selección tamaños corporales diferenciales con el propósito de definir *a posteriori* las tallas (LRC: longitud rostro-cloaca) de los especímenes juveniles y adultos. Se usó asimismo material recolectado el año anterior (octubre – diciembre) y del presente año (febrero) perteneciente a la Colección del Museo de Historia Natural, Escuela de Biología, Universidad Industrial de Santander.

2.3 ANÁLISIS MACROSCÓPICOS

Los machos capturados fueron llevados al Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados de la Universidad Industrial de Santander e inyectados letalmente con roxicaina al 2%. Cada individuo fue pesado usando una balanza digital (± 0.001 g) y se registraron las siguientes variables morfométricas usando un calibrador dial (± 0.02 mm): longitud rostro – cloaca y longitud total; longitud, ancho y alto de la cabeza. Posteriormente, cada individuo fue disecado ventralmente y se llevó un

registro fotográfico a fin de describir aspectos como la simetría testicular, convolución del epidídimo y ductos deferentes, así como las diferencias observables entre el tracto reproductivo izquierdo y derecho.

Siguiendo el procedimiento estándar en serpientes, se extrajo el tracto reproductivo derecho y se realizó el registro morfométrico: 1) longitud, ancho y espesor testicular, 2) ancho del ducto deferente en la porción proximal, medial y distal (entre el riñón y la cloaca), 3) longitud del riñón y 4) ancho del riñón en la región proximal, medial y distal utilizando un calibrador dial (0.02 mm de precisión). Posteriormente, se calculó el volumen testicular usando la fórmula elipsoidal ($4/3\pi a.b.c$; donde $a = \text{longitud}/2$, $b = \text{ancho}/2$, y $c = \text{espesor}/2$) (Pleguezuelos & Feriche, 1999). Finalmente, el testículo derecho de cada individuo fue removido y pesado usando una balanza digital ($\pm 0.001\text{g}$).

2.4 PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Los especímenes fueron fijados en formaldehído amortiguado al 10%, preservados en etanol al 70% e incluidos en la Colección Herpetológica del Museo de Historia Natural de la Universidad Industrial de Santander (UIS-R).

2.5 ANÁLISIS MICROSCÓPICOS

El tracto reproductivo derecho extraído de cada individuo fue fijado en formaldehído amortiguado al 10% y preservado en alcohol al 70% para el respectivo análisis microscópico. De cada espécimen, se obtuvo porciones de la región media testicular, secciones de la región distal del ducto deferente (fragmento entre el riñón y la cloaca) y de la región proximal del riñón donde se localiza el segmento sexual del riñón. Las muestras fueron deshidratadas en una serie ascendente de etanol, aclaradas en xilol e incluidas en parafina, según el protocolo propuesto por Luna (1968). Posteriormente, se realizaron cortes histológicos transversales (testículo, epidídimo, riñón y ducto deferente) y sagitales (riñón) a 5 – 7 μm de espesor en un micrótopo rotatorio Accu-Cut® SRM™ 200. Las secciones obtenidas fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H – E) y los cortes de riñón y ductos deferentes fueron sometidos a la tinción del ácido peryódico de Schiff (PAS) para identificación de carbohidratos neutros y azul de alcian (AB) pH 2.5 para la identificación de glicosaminoglicanos carboxilados (Luna, 1968).

Los cortes histológicos fueron visualizados con un microscopio Nikon H-550S® con cámara incorporada Canon EOS®. Los cambios estructurales en los testículos

fueron verificados registrando el diámetro tubular y altura del epitelio de los túbulos seminíferos. Además, se registró el diámetro tubular y altura epitelial del segmento sexual del riñón utilizando el software ImageJ (Abrámoff et al., 2004). Fueron realizadas 15 mediciones de cada variable para cada macho estudiado.

Las variaciones estructurales y morfológicas de los túbulos seminíferos y su intersticio se usaron para caracterizar la actividad espermatogénica teniendo como referencia a Goldberg & Parker (1975). Estos autores definieron el ciclo reproductivo en serpientes macho usando seis estados: I (regresión completa), II (recrudescencia temprana), III (recrudescencia tardía), IV (espermiogénesis temprana), V (espermiogénesis) y VI (regresión temprana). Finalmente, la caracterización del segmento sexual del riñón se hizo mediante comparaciones observables teniendo como referencia a Krohmer et al. (2004), quienes definieron cinco categorías: 0 = hipertrofia no observable, 1 = hipertrofia con pocos gránulos, 2 = hipertrofia con presencia de gránulos a través del citoplasma de todas las células epiteliales, 3 = gránulos secretores visibles en la región apical del citoplasma, 4 = densidad máxima de gránulos secretores dentro del citoplasma.

La condición reproductiva de los individuos fue determinada por la presencia de esperma en los túbulos seminíferos y en el lumen de los ductos deferentes, caracterizando así a los individuos juveniles (sin espermatozoides) y adultos.

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Mediante un test de G se probó si existían diferencias en la composición de la población (adultos y juveniles) a través del año, agrupando los meses en cuatro categorías: Abril - Mayo y Octubre – Noviembre (meses con los picos de precipitación) y Junio – Septiembre y Diciembre – Marzo (meses con bajos valores de precipitación).

Se examinó la existencia de relación entre las variables morfométricas macroscópicas y la longitud rostro - cloaca (LRC) mediante regresiones. Después, se analizó si existían diferencias significativas entre las estaciones definidas por las lluvias usando un ANCOVA con la LRC como covariable y las variables gonadales transformadas (volumen testicular y masa testicular) para satisfacer la asunción de normalidad *a priori* en los análisis. Mediante una prueba de t de Student se determinó la variación entre los valores históricos de precipitación (IDEAM) y los valores para los meses de muestreo (IDEAM, 2014 – 2015). Además, para determinar el efecto de la precipitación en la actividad reproductiva se realizó una correlación de Spearman entre los valores de precipitación y el volumen testicular ajustado y la masa testicular; la relación entre la temperatura y la precipitación no

fue examinada debido a que la temperatura permaneció casi constante durante el año de estudio.

Para las variables que no estaban significativamente relacionadas con el tamaño corporal (longitud y ancho del riñón, ancho de ductos deferentes) se determinó si existían diferencias significativas entre estaciones usando un análisis de varianza (ANOVA). Además, se analizó si existían variaciones significativas entre las variables microscópicas (diámetro y altura de los túbulos seminíferos y del segmento sexual del riñón) mediante la prueba de Kruskal Wallis. En caso de encontrar diferencias en las pruebas estadísticas, se realizó un test de rango *post hoc* (test de Tukey para datos paramétricos) y comparaciones por el método de Dunn para datos no paramétricos. Todos los análisis estadísticos fueron hechos en el software estadístico PAST versión 2.17c (Hammer et al., 2001), asumiendo $P < 0.05$ como criterio de significancia.

3. RESULTADOS

3.1 Descripción macroscópica del tracto reproductivo de los machos de *Atractus* sp.

Un total de 49 machos fueron analizados y clasificados como juveniles (8) y adultos (41). Los machos de esta población de *Atractus* sp. presentan testículos asimétricos de coloración blanca y forma elíptica, ubicándose el testículo derecho más rostralmente que el izquierdo (Fig. 1). El epidídimo en ambos estados reproductivos (juveniles y adultos) es delgado y similar en tamaño y forma, siendo convoluto o no (individuos maduros y juveniles, respectivamente). Los riñones son lobulados y asimétricos, con elevado número de protuberancias en los adultos que corresponden al segmento sexual del riñón (Ssr, Fig. 1a), mientras que en los juveniles se observa altamente vascularizado (Fig. 1b). La longitud del riñón y los testículos varían entre tractos reproductivos, existiendo una relación inversa de ambos órganos de cada lado (riñón izquierdo más largo que el derecho y testículo izquierdo de menor longitud que el derecho, en el mismo individuo). Generalmente, el ducto deferente derecho es de mayor longitud que el izquierdo, siendo convolutos y opacos en machos maduros y en individuos estimulados (subadultos), mientras que en juveniles son traslúcidos y delgados (Fig. 1a y 1b, respectivamente).

3.2 Descripción microscópica

3.2.1 Ciclo espermatogénico de *Atractus* sp.

Los testículos son similares a los de otros reptiles, compuestos de túbulos seminíferos y rodeados por una capa delgada de tejido conectivo (túnica albugínea) (Fig. 2A). No se encontró variación histológica testicular entre meses en los individuos adultos y juveniles, pero sí entre ambas categorías. Los especímenes adultos presentaron un epitelio seminífero con 5 a 7 capas celulares, compuesto mayoritariamente por espermatocitos primarios y espermatídes en maduración (Fig. 2B), con abundancia de espermatozoides en el borde y el lumen celular (Fig. 2B y 2C). Todos los individuos adultos analizados fueron clasificados en el estado de espermiogénesis (espermatozoides maduros en el lumen). El conducto epididimario en los individuos adultos es un tubo contorneado limitado externamente por la serosa, seguido de algunas fibras musculares, un conjuntivo delgado y un epitelio luminal columnar alto, con núcleos basales y en la mayoría de los casos, lumen con

presencia de espermatozoides (Fig. 2C y 2D). Los conductillos epididimarios son túbulos reducidos con epitelio luminal cilíndrico simple y rodeados de un conjuntivo laxo. Los conductillos eferentes presentan tejido epitelial cúbico simple y se encuentran estrechamente asociados a los túbulos seminíferos y a los conductos epididimarios conectándolos entre sí.

Los individuos juveniles presentaron testículos con epitelio seminífero y lumen reducido, en algunos casos inexistente. Se observó predominancia de espermocitos y espermátides no diferenciadas (Fig. 2E), correspondiente al estado de recrudescencia tardía y espermiogénesis temprana (espermocitos secundarios y espermátides en metamorfosis, respectivamente). El conducto epididimario en juveniles carece de espermatozoides, aunque presenta una histología similar al adulto, difiriendo en tamaño y organización, estando ubicado en la porción más apical del testículo con respecto a los túbulos seminíferos. Los conductillos eferentes poseen tejido epitelial cúbico simple y carecen de material luminal (Fig. 2F).

3.2.2 Segmento sexual del riñón de *Atractus* sp.

El segmento sexual del riñón (Ssk) en individuos adultos consiste de una serie de túbulos alargados en la zona anterior y moderadamente esféricos en la región posterior. En los especímenes adultos, el Ssk se encuentra hipertrofiado, diferenciándose claramente de los túbulos proximales contorneados adyacentes (Fig. 3A). El Ssk está conformado por túbulos de lumen reducido que poseen un epitelio columnar simple, granular eosinófilo, con núcleos basales. Estos túbulos están adyacentes a los túbulos contorneados proximales (Fig. 3B). Estos últimos poseen un lumen amplio y están conformados por un epitelio cúbico simple, basófilo no granular.

El Ssk de los juveniles es no hipertrofiado y poco diferenciado de los demás túbulos del riñón (Fig. 3C). El segmento sexual del riñón es similar a los túbulos contorneados proximales (Tcp) del adulto, excepto por el material claro pero eosinófilo del citoplasma (Fig. 3D).

3.2.3 Ductos deferentes distales de *Atractus* sp.

Los ductos deferentes de los individuos adultos presentan un epitelio luminal pseudoestratificado no plegado, con células cuboidales a columnares, un citoplasma basófilo; bajo el epitelio se encuentra un conjuntivo delgado y una capa

muscular lisa y la serosa (Fig. 4A). En el lumen del ducto deferente de todos los machos adultos se encontraron espermatozoides asociados a un material eosinófilo, sin diferencias en la densidad espermática durante todo el año (Fig. 4B).

La ampolla del ducto deferente (región terminal del ducto deferente) presenta dos componentes: glandular y estructural (almacenamiento de esperma) (Fig. 4C). Además, presenta un epitelio luminal más alto que el resto del ducto deferente con proyecciones irregulares leves. Este epitelio se encuentra rodeado externamente por una capa de tejido conjuntivo delgada y una capa gruesa de músculo liso (Fig. 4D). En el interior del lumen se observa un elevado número de espermatozoides inmersos en una matriz similar al presente en los ductos deferentes.

Los ductos deferentes de los individuos juveniles están rodeados por músculo liso (Fig. 4E) y a diferencia de los adultos, el epitelio luminal del ducto deferente es columnar ciliado, con invaginaciones y un lumen sin espermatozoides (Fig. 4F).

La presencia de espermatozoides en los túbulos seminíferos, epidídimo y ductos deferentes de los machos adultos durante todo el año, indican que esta población de *Atractus* sp. presenta reproducción continua.

3.2.4 Histoquímica del SSK y ductos deferentes distales de *Atractus* sp.

El segmento sexual del riñón (Ssk) de los especímenes adultos mostró gran densidad de gránulos citoplasmáticos positivos a la reacción de PAS (Fig. 5A), indicando la presencia de carbohidratos neutros y actividad secretora continua. Los túbulos contorneados proximales fueron positivos a la reacción de azul de alcian (AB) debido a la presencia de mucopolisacáridos carboxilados (Fig. 5A). La composición granular no varió durante el año de estudio, observándose permanentemente una densidad máxima de los gránulos secretores citoplasmáticos.

El Ssk de los individuos juveniles fue débilmente positivo a la reacción de PAS, solamente en el borde luminal, sin evidencia de gránulos citoplasmáticos en el epitelio luminal. La reacción positiva de azul de alcian indicó la presencia de mucopolisacáridos en los túbulos proximales del riñón (Fig. 5B). La ausencia de gránulos citoplasmáticos en el epitelio luminal de los túbulos del Ssk fue observada en todos los machos juveniles.

El tejido conjuntivo que rodea a los ductos deferentes distales en los adultos fue positivo para PAS. También se observa una reacción de azul de alcian positiva sobre el epitelio; sin embargo, esta reacción se limita al borde luminal (Fig. 5C y 5D). El material secretor asociado a los espermatozoides fue positivo para PAS

indicando presencia de carbohidratos neutros, mientras que la región externa de la masa espermiática fue positiva para la reacción azul de alcian (AB).

El epitelio luminal del ducto deferente distal de los juveniles fue negativo a la reacción de PAS, aunque positivo para AB en la cara luminal del epitelio (Fig. 5E). El borde del epitelio luminal y algunas células columnares del epitelio fueron intensamente positivas a la reacción azul de alcian, señalando la secreción de glicosaminoglicanos carboxilados (Fig. 5F).

3.3 Estructura poblacional de *Atractus* sp.

Los individuos fueron colectados durante todos los meses, siendo enero el único mes sin capturas (Fig. 6). No hay diferencias en la ocurrencia de machos adultos ($G_{0.05, 9} = 11.09$, $P = 0.27$), ni en los machos juveniles ($G_{0.05, 10} = 8.31$, $P = 0.216$) entre estaciones. Los individuos juveniles fueron colectados en Marzo (1), Abril (4), Junio (1), Septiembre (1) y Octubre (1).

El individuo más pequeño reproductivamente activo fue de 137 mm de LRC (longitud rostro – cloaca) de Agosto. Los individuos adultos oscilaron entre 137 mm -305 mm ($\bar{X} = 257.1$ mm; $DE = \pm 38.2$, Fig. 6), siempre presentaron testículos grandes y epidídimos convolutos. Los neonatos eclosionaron con un tamaño aproximado de 78 mm de LRC, siendo considerados juveniles todos los especímenes menores de 137 mm (rango generado mediante inspección de los tractos reproductivos e imágenes histológicas).

3.4 Variación morfométrica de *Atractus* sp.

Se encontró relación significativa entre el volumen testicular y la longitud rostro – cloaca ($r^2 = 0.84$, $F_{1,47} = 245.5$, $P < 0.001$) y entre la masa testicular y corporal ($r^2 = 0.577$, $F_{1,47} = 64.8$, $P < 0.001$). No hay variación en el volumen testicular ajustado (ANCOVA, $F_{10,36} = 1.05$, $P = 0.36$) y la masa testicular (ANCOVA, $F_{10,36} = 1.42$, $P = 0.27$) entre estaciones. No se encontró diferencias significativas en la longitud del riñón ($F_{3,45} = 0.575$, $n = 49$, $P = 0.634$), en el ancho del riñón ($F_{3,45} = 2.66$, $n = 49$, $P = 0.059$) ni en el ancho de los ductos deferentes ($F = 1.35$, $n = 49$, $P = 0.269$).

Por otra parte, los valores históricos de lluvias y los valores de los meses de muestreo no presentaron diferencias ($t_{11} = 0.988$, $P = 0.345$). Además, las variables gonadales (Spearman, volumen testicular $R^2 = 0.392$, $P = 0.208$; masa testicular $R^2 = 0.287$, $P = 0.365$) no se vieron afectadas por la precipitación.

Considerando los datos obtenidos mediante técnicas histológicas, no se encontró diferencias significativas en la altura epitelial del SSK entre estaciones ($F_{3,161} = 0.761$, $n = 165$, $P = 0.517$). La altura del epitelio seminífero varió significativamente entre estaciones ($H = 11.7$, $n = 165$, $P = 0.008$). El análisis de rango *Post hoc* (test de Dunn) indicó que la altura del epitelio en el período Dic – Mar (A) presentó mayor longitud que Jun – Sep (D) ($P < 0.05$; Fig. 7A). Además, se encontró variación entre las épocas del año en el diámetro de los túbulos seminíferos ($H = 29.8$, $n = 30$, $P < 0.001$) con un incremento en el período Jun – Sep (D) sobre Abr – May (C) ($P < 0.05$, método de Dunn, Fig. 7B). El diámetro tubular del segmento sexual del riñón (SSK) difirió entre meses ($H = 31.7$, $n = 165$, $P < 0.001$) y un test de rango *Post hoc* (método de Dunn) señaló un aumento en los meses Jun – Sep (D) en relación a Oct – Nov (A) y Abr – May (C) ($P < 0.05$, Fig. 7C).

4. DISCUSIÓN

Morfología – Los machos juveniles y adultos de *Atractus* sp. poseen testículos asimétricos similares a los reportados en la mayoría de serpientes (Volsøe, 1944), estando ubicado el testículo derecho más rostralmente que el izquierdo (Fox, 1952). La longitud testicular de ambos tractos reproductivos en *Atractus* sp. difiere. En algunos especímenes el testículo derecho es más largo, mientras que en otros es el izquierdo, encontrándose diferencias con lo reportado para la mayoría de especies neotropicales (Fox, 1958; Sever, 2004) donde típicamente el testículo derecho es más largo que el izquierdo.

El riñón de *Atractus* sp. presenta características macroscópicas similares a las reportadas en otras serpientes (Gribbins et al., 2008; Sever et al., 2008) siendo macroscópicamente visible el segmento sexual del riñón (SSK). Estudios realizados en riñón de escamados, señalan que el SSK es una porción modificada del riñón ubicada en la región anterior (Bishop, 1959) o en algunos escamados localizada terminal o preterminalmente. Sin embargo, en *Atractus* sp. estos túbulos están presentes a lo largo del riñón disminuyendo su diámetro hacia la parte inferior del mismo.

Los ductos deferentes de *Atractus* sp. presentan asimetría lateral y el ducto deferente derecho es más largo que el izquierdo, similar a lo reportado en *Seminatrix pygaea* (Sever, 2004). Los individuos juveniles con tallas cercanas a los 137 mm (madurez sexual) presentaron epidídimos y/o ductos deferentes convolutos siendo necesario el análisis histológico para así generar la asignación categórica (juveniles – adultos).

Histología – La histología testicular de los individuos juveniles y adultos, es similar no sólo a lo reportado en serpientes sino en otros escamados (Raynaud & Peiau, 1985; Volsøe, 1944). El epidídimo de *Atractus* sp. es similar histológicamente al reportado en otras especies (Fox, 1977; Saint Girons, 1985; Sever, 2004; Siegel et al., 2009) e incluso en otros reptiles (Akbarsha et al., 2007; Guerrero et al., 2004; Holmes & Gist, 2004), con predominancia de epitelio luminal columnar alto. La presencia de espermatozoides en la mayoría de conductillos epididimarios en *Atractus* sp. indica que los espermatozoides tienen flujo continuo desde los conductos hacia los ductos deferentes distales; contrario a lo reportado en otras serpientes donde se observó individuos adultos con esperma sólo en los ductos deferentes distales (Jones, 1998; Sever, 2004).

El segmento sexual del riñón presentó epitelio columnar con granulación eosinófila similar a lo reportado en otras especies (Rojas et al., 2013; Siegel et al., 2009). El citoplasma del SSK fue positivo para la reacción de PAS en los individuos adultos,

sin variación anual en la composición granular citoplasmática indicando intensa actividad secretora glicoproteica. Los análisis realizados que involucran el segmento sexual del riñón (SSK) se han hecho sólo en especies neotropicales y subtropicales encontrando relación entre los picos espermatogénicos y la máxima actividad granular exclusiva de los meses reproductivos (Rojas et al., 2013; Sever et al., 2008; Sever et al., 2012; Siegel et al., 2009). En *Atractus* sp. la hipertrofia del SSK de los individuos adultos fue continua y sincrónica con la actividad espermatogénica (espermiación continua) siendo un importante indicativo de madurez sexual (Rheubert et al., 2011).

Los individuos juveniles presentaron un SSK no hipertrofiado y débilmente positivo a la reacción de PAS, similar a lo reportado en individuos juveniles de *Nerodia rhombifera* (Khromer et al., 2004) en los que se evidenció la no hipertrofia del SSK.

La mayoría de reportes en especies subtropicales y neotropicales (Sever, 2004; Rojas et al., 2013) señalan reacción positiva de PAS en el borde del epitelio luminal del ducto. Sin embargo, los espermatozoides se encuentran inmersos en un material globular positivo a la reacción de PAS, indicando que en algún momento las células del epitelio secretaron estos carbohidratos neutros; al parecer, necesarios para la nutrición y el sostenimiento del esperma (Siegel et al., 2009).

La ampolla deferente, ausente en algunos amniotas (Setchell et al., 1994) ha sido ampliamente estudiada en especies de serpientes neotropicales (Rojas et al., 2013) y recientemente, en subtropicales (Sever, 2004; Sever et al., 2008). La función y morfología de la ampolla difiere entre escamados (Trauth & Sever, 2011). La presencia de la ampolla ductal en *Atractus* sp. supone que podría darse el almacenamiento del esperma. Sin embargo, es necesario realizar estudios ultraestructurales que permitan revelar si la morfología es conservada entre especies tropicales y de zonas templadas. Además, para evaluar en *Atractus* sp. si se da la fagocitosis del esperma dentro de la ampolla ductal, como se ha observado en otros escamados (Akbarsha et al., 2005).

Morfometría – Los machos adultos de *Atractus* sp. no presentaron variación en la morfometría macroscópica (testículo, ductos deferentes y riñón) a lo largo del año, similar a lo reportado en especies tropicales de reproducción continua (Fitch, 1972; Goldberg, 2006; Pizzato & Marquez, 2002) donde también se ha evaluado la relación de los factores climáticos y la biología reproductiva de las especies. Mientras que en especies neotropicales y subtropicales con reproducción estacional, los picos reproductivos generalmente están asociados a aumentos en la morfometría gonadal (Goldberg & Parker, 1975; Marquez et al., 2006).

Las variaciones morfométricas microscópicas (altura y diámetro seminífero, diámetro del SSK) podría deberse a fluctuaciones en los niveles de testosterona, similar a lo reportado en otras especies (Scartozzoni et al., 2009; Pinto et al., 2010).

Sin embargo, es necesario realizar análisis complementarios que permitan dilucidar si hay o no dicha variación. A pesar, de las variaciones registradas no se observa estacionalidad debido a que no se encontró variación en el estado espermatogénico siendo constante durante el año de estudio.

Estructura poblacional – Machos de *Atractus* sp. de rangos diferenciales de tamaño fueron encontrados durante el año de muestreo excepto en el mes de enero, siendo este el mes con menor precipitación. Estudios de capturas realizadas en serpientes neotropicales semifosoriales indicaron una reducción en la tasa de encuentro en meses cálidos con baja precipitación (Wilson & Dorkas, 2004). Además, el bajo número de juveniles durante todo el tiempo de estudio, posiblemente se dio por sesgo de muestreo debido al reducido tamaño y a los hábitos semifosoriales de la especie. El tamaño de los neonatos fue similar al descrito para otras especies del género (Giraudo & Scrocchi, 2000; Balestrin & Bernardo, 2005). El tamaño de madurez sexual reportado en la población estudiada (137 mm) es similar al encontrado en *Atractus elaps* (150 mm, longitud máxima de 560 mm) en Ecuador (Carvajal & Rodriguez, 2013), difiriendo del reportado en *Atractus reticulatus* (198 mm, longitud máxima de 279 mm) en Brasil (Balestrin & Bernardo, 2005).

La presencia permanente de machos adultos reproductivos, sugiere que la población de *Atractus* sp. presenta reproducción continua. Martins & Oliveira (1993, 1998) investigaron la biología reproductiva de ocho especies de *Atractus* en el Sur de Brasil (*A. alphonsehoguei*, *A. latifrons*, *A. major*, *A. poeppigi*, *A. schach*, *A. snethlageae*, *A. torquatus* y *A. trilineatus*) en zonas subtropicales, indicando reproducción continua en sólo dos especies (*A. latifrons* y *A. torquatus*). En *Atractus reticulatus* (Balestrin & Bernardo, 2005) en Ecuador y *Atractus pantostictus* (Cassimiro et al., 2002) en Brasil, se encontró reproducción estacional.

Estudios realizados en el Sur de Brasil en géneros de serpientes cercanas filogenéticamente, basados en Graziotin (2012), sugieren reproducción estacional estricta en *Hypsiglena torquata* (Goldberg, 2001), *Ninia maculata* (Goldberg, 2004b), *Sibynomorphus* spp, y *Dipsas albifrons* (Pizzato et al., 2008a), *Phylodrias offersii* (de Mesquita et al., 2013), *Sibynomorphus mikanii* (Rojas et al., 2013) limitada a los meses más cálidos. Mientras que *Leptodeira maculata* y *Leptodeira punctata* (Goldberg, 2004a) en México, presentan reproducción prolongada pero estacional asociada a todas las épocas del año excepto invierno.

Lo anterior indica que en los patrones reproductivos de especies subtropicales y neotropicales son determinantes factores ambientales como la precipitación, humedad relativa, aunque especialmente, la temperatura ambiental (Peterson et al., 1993). Se ha demostrado que en lugares donde fluctúa la precipitación y la humedad relativa, pero la temperatura ambiental permanece constante, la mayoría de especies son de reproducción continua (Fitch, 1982; Pizzato & Marques, 2002;

Brown & Shine, 2006). Es el caso de la población de *Atractus* sp., a pesar del régimen bimodal de la zona, no se vio afectada la reproducción continua. Así, según la clasificación propuesta por Mathies (2011) la población de *Atractus* sp. tiene un patrón reproductivo continuo acíclico sin variación en la actividad gonadal anual.

5. CONCLUSIONES

Los machos de la población de *Atractus* sp. presentaron reproducción continua durante el año de estudio, sin variación en la actividad gonadal.

El tracto reproductivo macro y microscópicamente de *Atractus* sp. es similar a los reportados en otros géneros de serpientes. Los especímenes de la población alcanzan la madurez sexual a los 137 mm longitud rostro – cloaca, siendo necesario tener en cuenta aspectos morfológicos macroscópicos e histológicos gonadales en la determinación de la madurez sexual.

Los machos de *Atractus* sp. presentaron una alta sincronía intra-sexual encontrándose todos los adultos y juveniles en el mismo estado del ciclo espermatogénico durante el año de estudio.

La población de *Atractus* sp. no experimentó cambios morfológicos, aunque sí morfométricos a nivel de los tejidos gonadales y del riñón, sin que esto indique estacionalidad o alteración del patrón de reproducción continua de la población.

BIBLIOGRAFÍA

ABRÀMOFF, Michael D.; MAGALHÃES, Paulo J.; RAM, Sunanda J. Image processing with ImageJ. *Biophotonics international*, 2004, vol. 11, no 7, p. 36-42.

AKBARSHA, Mohammad A.; KADALMANI, Balamuthu; TAMILARASAN, Veeramuthu. Efferent ductules of the fan-throated lizard *Sitana ponticeriana* Cuvier: light and transmission electron microscopy study. *Acta Zoologica*, 2007, vol. 88, no 3, p. 265-274.

ALDRIDGE, Robert D.; SEVER, David M. (ed.). *Reproductive biology and phylogeny of snakes*, 2011, p. 477-509.

ALMEIDA-SANTOS, SELMA MARIA; SALOMÃO, M. G. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. *Biology of the Vipers. Utah: Eagle Mountain Publishing*, 2002, p. 445-462.

BALESTRIN, Rafael Lucchesi; DI-BERNARDO, Marcos. Reproductive biology of *Atractus reticulatus* (Boulenger, 1885)(Serpentes, Colubridae) in southern Brazil. *The Herpetological Journal*, 2005, vol. 15, no 3, p. 195-199.

BARROS, Verônica Alberto; SUEIRO, Leticia Ruiz; ALMEIDA-SANTOS, Selma Maria. Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of phylogenetic conservatism of reproductive patterns. *The Herpetological Journal*, 2012, vol. 22, no 2, p. 97-104.

BISHOP, Jane E. A histological and histochemical study of the kidney tubule of the common garter snake, *Thamnophis sirtalis*, with special reference to the sexual segment in the male. *Journal of Morphology*, 1959, vol. 104, no 2, p. 307-357.

BROWN, G. P.; SHINE, R. Why do most tropical animals reproduce seasonally? Testing hypotheses on an Australian snake. *Ecology*, 2006, vol. 87, no 1, p. 133-143.

CARVAJAL, C. A., & RODRIGUEZ, G. *Atractus elaps*. Reptilia Web Ecuador, Museo de Zoología QCAZ, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2013.

FERNANDES, R.; PUERTO, G. A new species of *Atractus* from Brazil and the status of *A. guentheri* (Serpentes: Colubridae). *Memo. Inst. Butantan*, 1993, vol. 55, no 1, p. 7-14.

FITCH, Henry S.; FLEET, Robert R. Natural history of the milk snake (*Lampropeltis triangulum*) in northeastern Kansas. *Herpetologica*, 1970, p. 387-396.

FOWLER, Ian R.; SALOMÃO, M. G.; JORDÃO, R. S. A description of the female reproductive cycle in four species from the neotropical colubrid snake *Philodryas* (Colubridae, Xenodontinae). *SNAKE-NITTAGUN-*, 1998, vol. 28, p. 71-78.

GIRAUDO, A. R. La diversidad de serpientes de la selva Paranaense y del Chaco húmedo (Argentina) Taxonomía, biogeografía y conservación. *Corrientes, LOLA. 281p.(Monografía)[Links]*, 2001.

GIRAUDO, A. R.; SCROCCHI, G. J. The genus *Atractus* (Serpentes: Colubridae) in north-eastern Argentina. *Herpetological Journal*, 2000, vol. 10, no 3, p. 81-90.

GOLDBERG, Stephen R. Reproduction in the striped racer, *Masticophis lateralis* (Colubridae). *Journal of Herpetology*, 1975, vol. 9, no 4, p. 361-363.

GOLDBERG, Stephen R. Reproduction in the ground snake, *Sonora semiannulata* (Serpentes: Colubridae), from Arizona. *The Southwestern Naturalist*, 2001, vol. 46, no 3, p. 387-391.

GOLDBERG, Stephen R. Notes on reproduction in the southwestern cat-eyed snake, *Leptodeira maculata*, and western cat-eyed snake, *Leptodeira punctata* (Serpentes: Colubridae), from Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 2004, vol. 49, no 3, p. 409-412.

GOLDBERG, Stephen R. Reproduction in the coffee snake, *Ninia maculata* (Serpentes: Colubridae), from Costa Rica. Reproducción en la serpiente del café, *Ninia maculata* (Serpentes: Colubridae), de Costa Rica. *The Texas Journal of Science.*, 2004, vol. 56, no 1, p. 81-84.

GOLDBERG, Stephen R. Reproductive cycle of the salmon-bellied racer, *Mastigodryas melanolomus* (Serpentes, Colubridae), from Costa Rica. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 2006, vol. 5, no 2, p. 145-148.

GRAHAM, Sean Patrick. An integrative analysis of reproduction and stress in free-living male Cottonmouths, *Agkistrodon piscivorus*. 2006.

GRAZZIOTIN, Felipe G., et al. Molecular phylogeny of the new world dipsadidae (Serpentes: Colubroidea): a reappraisal. *Cladistics*, 2012, vol. 28, no 5, p. 437-459.

GRIBBINS, Kevin M.; GIST, Daniel H.; CONGDON, Justin D. Cytological evaluation of spermatogenesis and organization of the germinal epithelium in the male slider turtle, *Trachemys scripta*. *Journal of Morphology*, 2003, vol. 255, no 3, p. 337-346.

GRIBBINS, Kevin M.; HAPP, Carrie S.; SEVER, David M. Ultrastructure of the reproductive system of the Black Swamp Snake (*Seminatrix pygaea*). V. The temporal germ cell development strategy of the testis. *Acta Zoologica*, 2005, vol. 86, no 4, p. 223-230.

GRIBBINS, Kevin M., et al. Histological analysis of spermatogenesis and the germ cell development strategy within the testis of the male Western Cottonmouth Snake,

Agkistrodon piscivorus leucostoma. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 2008, vol. 190, no 5, p. 461-476.

HAMMER, Øyvind; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST-PAlaeontological Statistics, ver. 1.35. *Users manual*, 2005.

HOLMES, Hilary J.; GIST, Daniel H. Excurrent duct system of the male turtle *Chrysemys picta*. *Journal of Morphology*, 2004, vol. 261, no 3, p. 312-322.

JONES, Susan M.; BENNETT, Ellen J.; SWADLING, Kerrie M. Lipids in yolks and neonates of the viviparous lizard *Niveoscincus metallicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, vol. 121, no 4, p. 465-470.

KROHMER, Randolph W.; GRASSMAN, Mark; CREWS, David. Annual reproductive cycle in the male red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*: field and laboratory studies. *General and comparative endocrinology*, 1987, vol. 68, no 1, p. 64-75.

KROHMER, Randolph W.; MARTINEZ, Dora; MASON, Robert T. Development of the renal sexual segment in immature snakes: effect of sex steroid hormones. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2004, vol. 139, no 1, p. 55-64.

LUNA, Lee G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 1968.

MARQUES, Otávio AV. Reproductive biology of the coral snake *Erythrolamprus aesculapii* Linnaeus (Colubridae) in the Southeastern Brazil. *Revista brasileira de Zoologia*, 1996, vol. 13, no 3, p. 747-753.

MARQUES, Otavio AV; ETEROVIC, André; SAZIMA, Ivan. *Serpentes da Mata Atlântica: guia ilustrado para a Serra do Mar*. Holos Editora, 2001.

MARQUES, Otavio AV, et al. Mating and reproductive cycle in the neotropical colubrid snake *Chironius bicarinatus*. *south american Journal of herpetology*, 2009, vol. 4, no 1, p. 76-80.

MARTINS, M.; OLIVEIRA, M. E. The snakes of the genus *Atractus* Wagler (Reptilia: Squamata: Colubridae) from the Manaus region, central Amazonia, Brazil. *Zoologische Mededelingen*, 1993, vol. 67, no 2, p. 21-40.

MARTINS, Marcio; OLIVEIRA, M. Ermelinda. Natural history of snakes in forests of the Manaus region, Central Amazonia, Brazil. *Herpetological Natural History*, 1998, vol. 6, no 2, p. 78-150.

MATHIES, T. Reproductive cycles of tropical snakes. *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*, 2011, p. 511-550.

DE PAULA OROFINO, Renata; PIZZATTO, Lígia; MARQUES, Otavio AV. Reproductive biology and food habits of *Pseudoboia nigra* (Serpentes: Dipsadidae) from the Brazilian cerrado. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 2010, vol. 9, no 1, p. 53-61.

PINTO, Roberta Richard; MARQUES, Otavio Augusto Vuolo; FERNANDES, Ronaldo. Reproductive biology of two sympatric colubrid snakes, *Chironius flavolineatus* and *Chironius quadricarinatus*, from the Brazilian Cerrado domain. *Amphibia-Reptilia*, 2010, vol. 31, no 4, p. 463-473.

PIZZATTO, Lígia; MARQUES, Otavio AV. Reproductive biology of the false coral snake *Oxyrhopus guibei* (Colubridae) from southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*, 2002, vol. 23, no 4, p. 495-504.

PIZZATTO, Lígia; MARQUES, Otavio AV. Interpopulational variation in reproductive cycles and activity of the water snake *Liophis miliaris* (Colubridae) in Brazil. *The Herpetological Journal*, 2006, vol. 16, no 4, p. 353-362.

PIZZATTO, Lígia; MARQUES, Otavio AV. Reproductive ecology of boine snakes with emphasis on Brazilian species and a comparison to pythons. *South American Journal of Herpetology*, 2007, vol. 2, no 2, p. 107-122.

PIZZATTO, Lígia; JORDÃO, Rosana S.; MARQUES, Otavio AV. Overview of reproductive strategies in Xenodontini (Serpentes: Colubridae: Xenodontinae) with new data for *Xenodon neuwiedii* and *Waglerophis merremii*. *Journal of Herpetology*, 2008, vol. 42, no 1, p. 153-162.

PIZZATTO, Lígia, et al. Reproductive ecology of dipsadine snakes, with emphasis on South American species. *Herpetologica*, 2008, vol. 64, no 2, p. 168-179.

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

RAYNAUD, Albert; PIEAU, C. Embryonic development of the genital system. *Biology of the Reptilia*, 1985, vol. 15, p. 149-300.

RESENDE, F. C.; NASCIMENTO, L. B. The Female Reproductive Cycle of the Neotropical Snake *Atractus pantostictus* (Fernandes and Puerto, 1993) from South-eastern Brazil. *Anatomia, histologia, embryologia*, 2015, vol. 44, no 3, p. 225-235.

RHEUBERT, Justin L., et al. Ultrastructural description of spermiogenesis within the Mediterranean Gecko, *Hemidactylus turcicus* (Squamata: Gekkonidae). *Micron*, 2011, vol. 42, no 7, p. 680-690.

ROJAS, Claudio A.; BARROS, Veronica A.; ALMEIDA-SANTOS, Selma M. The reproductive cycle of the male sleep snake *Sibynomorphus mikanii* (Schlegel, 1837) from southeastern Brazil. *Journal of morphology*, 2013, vol. 274, no 2, p. 215-228.

RUBENSTEIN, Dustin R.; WIKELSKI, Martin. Seasonal changes in food quality: a proximate cue for reproductive timing in marine iguanas. *Ecology*, 2003, vol. 84, no 11, p. 3013-3023.

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

ROVERI SCARTOZZONI, Rodrigo; DA GRAÇA SALOMÃO, Maria; DE ALMEIDA-SANTOS, Selma Maria. Natural history of the vine snake *Oxybelis fulgidus* (Serpentes, Colubridae) from Brazil. *South American Journal of Herpetology*, 2009, vol. 4, no 1, p. 81-89.

SCHUETT, GORDON W., et al. Mating system of male Mojave rattlesnakes (*Crotalus scutulatus*): seasonal timing of mating, agonistic behavior, spermatogenesis, sexual segment of the kidney, and plasma sex steroids. *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain, Utah, USA, 2002, p. 515-532.

SEIGEL, R. A.; FORD, N. B. Reproductive ecology. *Snakes: ecology and evolutionary biology*, 1987, vol. 8, p. 210-252.

SEIGEL, R. A.; HUGGINS, M. M.; FORD, N. B. Reduction in locomotor ability as a cost of reproduction in gravid snakes. *Oecologia*, 1987, vol. 73, no 4, p. 481-485.

SEVER, David M.; HOPKINS, William A. Oviductal sperm storage in the ground skink *Scincella laterale* Holbrook (Reptilia: Scincidae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 2004, vol. 301, no 7, p. 599-611.

Sever, D. M., & Hopkins, W. A. (2005). Renal sexual segment of the ground skink, *Scincella laterale* (Reptilia, Squamata, Scincidae). *Journal of Morphology*, 266(1), 46-59.

SIEGEL, Dustin S., et al. Reproductive biology of *Agkistrodon piscivorus* Lacépede (Squamata, Serpentes, Viperidae, Crotalinae). *Herpetological Monographs*, 2009, vol. 23, no 1, p. 74-107.

SHINE, Richard. Intersexual dietary divergence and the evolution of sexual dimorphism in snakes. *American Naturalist*, 1991, p. 103-122.

SHINE, R. Sexual dimorphism in snakes. *Snakes: ecology and behavior*, 1993, p. 49-86.

SHINE, Richard. Reproductive strategies in snakes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2003, vol. 270, no 1519, p. 995-1004.

SIEGEL, Dustin S., et al. Reproductive biology of *Agkistrodon piscivorus* Lacépede (Squamata, Serpentes, Viperidae, Crotalinae). *Herpetological Monographs*, 2009, vol. 23, no 1, p. 74-107.

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

WEATHERHEAD, Patrick J.; BOAG, Peter T. Pair and extra-pair mating success relative to male quality in red-winged blackbirds. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 1995, vol. 37, no 2, p. 81-91.

ANEXOS

LEYENDA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del tracto reproductivo de serpiente macho *Atractus* sp. (A) Individuo adulto. (B) Individuo juvenil. Se indica el testículo derecho (TD) e izquierdo (TI), el epidídimo derecho e izquierdo (ED y EI), el ducto deferente anterior derecho (DAD) e izquierdo (DAI), el riñón derecho (RD) y riñón izquierdo (RI), el segmento sexual del riñón (SSR) y los ductos deferentes distales derecho e izquierdo (DDD y DDI, respectivamente).

Figura 2. Secciones transversales de testículo de *Atractus* sp. que incluyen epidídimo. Secciones teñidas con hematoxilina – eosina (H-E). (A) Espécimen de 270 mm de LRC (longitud rostro – cloaca) del mes de Octubre, indicando la organización de los túbulos seminíferos; (B) epitelio espermático en diferentes estados de división celular; (C) macho de 219 mm del mes de Septiembre donde se observa la red de ductos colectores adyacentes al testículo; (D) segmento extratesticular donde se observan espermatozoides en los conductillos epididimales; (E) túbulos seminíferos de un macho juvenil de 88 mm del mes de Abril con lumen reducido, carente de espermatozoides; (F) red excurrente testicular de un individuo juvenil con ausencia de espermatozoides en los conductillos epididimarios. Ce: conductillos eferentes, Cep: conductos epididimarios; Ec: Conductillos epididimario; Es: epitelio seminífero; Et: espermátide; L: lumen; Sz: espermatozoides; Ts: túbulo seminífero. Barra de escala: (A) 150 μm , (B y E) 80 μm , (C y D) 60 μm ; (F) 120 μm .

Figura 3. Secciones transversales de riñón de *Atractus* sp. (H-E). Secciones teñidas con hematoxilina – eosina (H-E). (A) Riñón de macho adulto de 305 mm del mes de Febrero; (B) detalle del segmento sexual renal y del túbulo contorneado proximal. (C) riñón de macho juvenil de 113 mm del mes de Junio; (D) segmento sexual del riñón de juvenil. Nb: núcleos basales, Pct: túbulos contorneados proximales, Ssk: segmento sexual del riñón. Barra de escala: (A) 330 μm , (B) 220 μm , (C) 180 μm y (D) 130 μm .

Figura 4. Secciones transversales del ducto deferente distal y ampolla deferente de *Atractus* sp. (H-E). (A) Macho de 263 mm de LRC del mes de Mayo en el cual se observa una gran masa espermática intraluminal; (B) se observan la células del epitelio y el esperma asociados; (C) ampolla deferente de un macho de 247 mm del mes de Agosto; (D) espermatozoides en el lumen de la ampolla deferente; (E) ducto deferente distal de un juvenil de 103 mm del mes de Septiembre carente de espermatozoides en el lumen; (F) detalle del epitelio luminal columnar y del conjuntivo y músculo liso adyacente. Ep: epitelio, L: lumen, Mu: músculo liso, Sr: serosa, Sz: espermatozoides. Barra de escala: (A y B) 120 μm , (C) 200 μm , (E) 100 μm y (F) 30 μm .

Figura 5. Reacciones con el reactivo de Schiff (PAS) y azul alcian (AB) del riñón y ductos deferentes distales de *Atractus* sp. (A) Riñón de macho adulto de 263 mm del mes de Mayo; (B) riñón de macho juvenil de 108 mm del mes de Abril; (C) ducto deferente distal de macho de 273 mm del mes de Julio; (D) masa espermática asociada a material positivo a PAS; (E) ducto deferente distal de macho juvenil de 103 mm del mes de Septiembre; (F) sección del ducto deferente positiva a AB. Cs: células columnares simples, L: lumen, Pct: túbulos contorneados proximales, Sz: espermatozoides, AB+: reacción de azul de alcian positiva, PAS+: reacción de ácido periódico de Schiff positiva. Barra de escala: (A) 150 μm , (B) 200 μm , (C) 180 μm , (D) 40 μm , (E) 160 μm y (F) 140 μm .

Figura 6. Distribución mensual y tamaños (LRC) de machos adultos (circulo negro) y machos juveniles (circulo gris) de *Atractus* sp.

Figura 7. Relación entre los picos de precipitación y el promedio de (A) Altura del epitelio seminífero, (B) Diámetro de los túbulos seminíferos y (C) Diámetro del segmento sexual del riñón (SSK) en *Atractus* sp. La línea media representa los valores promedio, las cajas muestran los errores estándar y los bigotes representan los valores mínimos y máximos. Además, se indican las estaciones que presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0.001$).

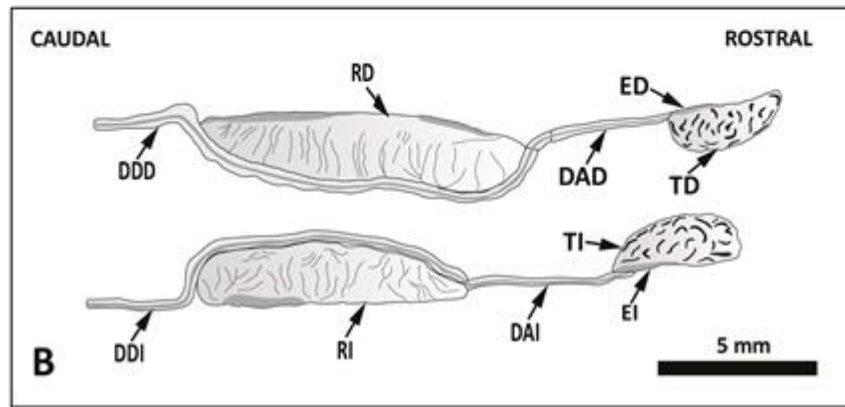
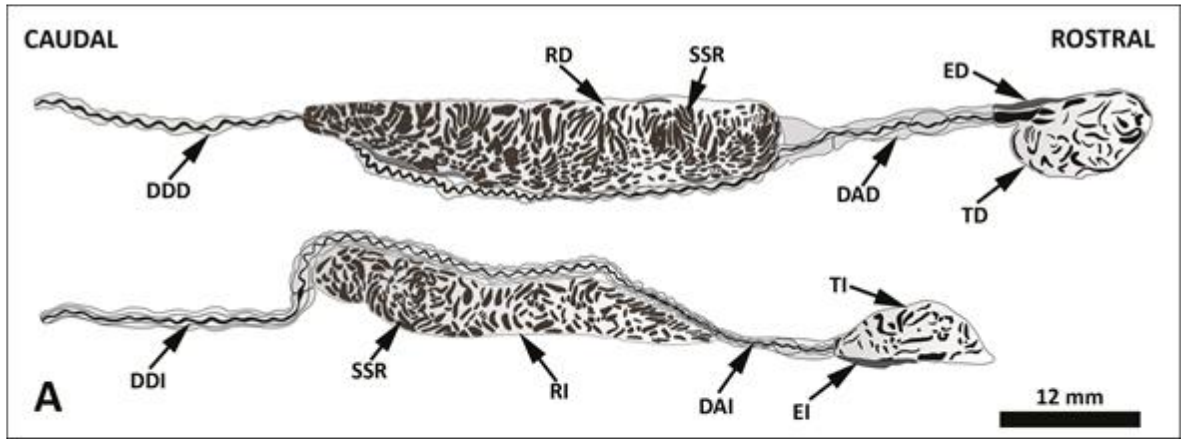


FIGURA 1.

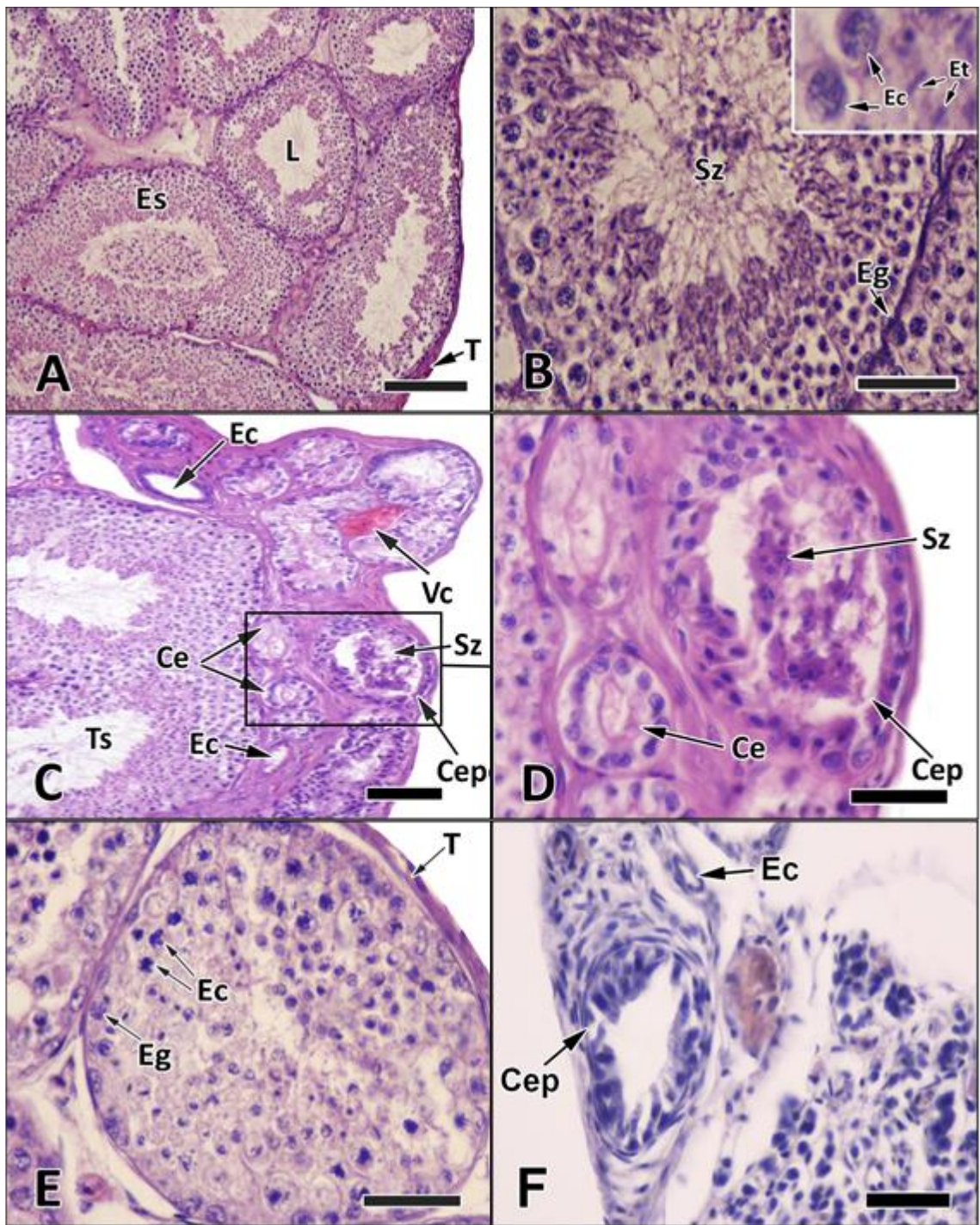


FIGURA 2.

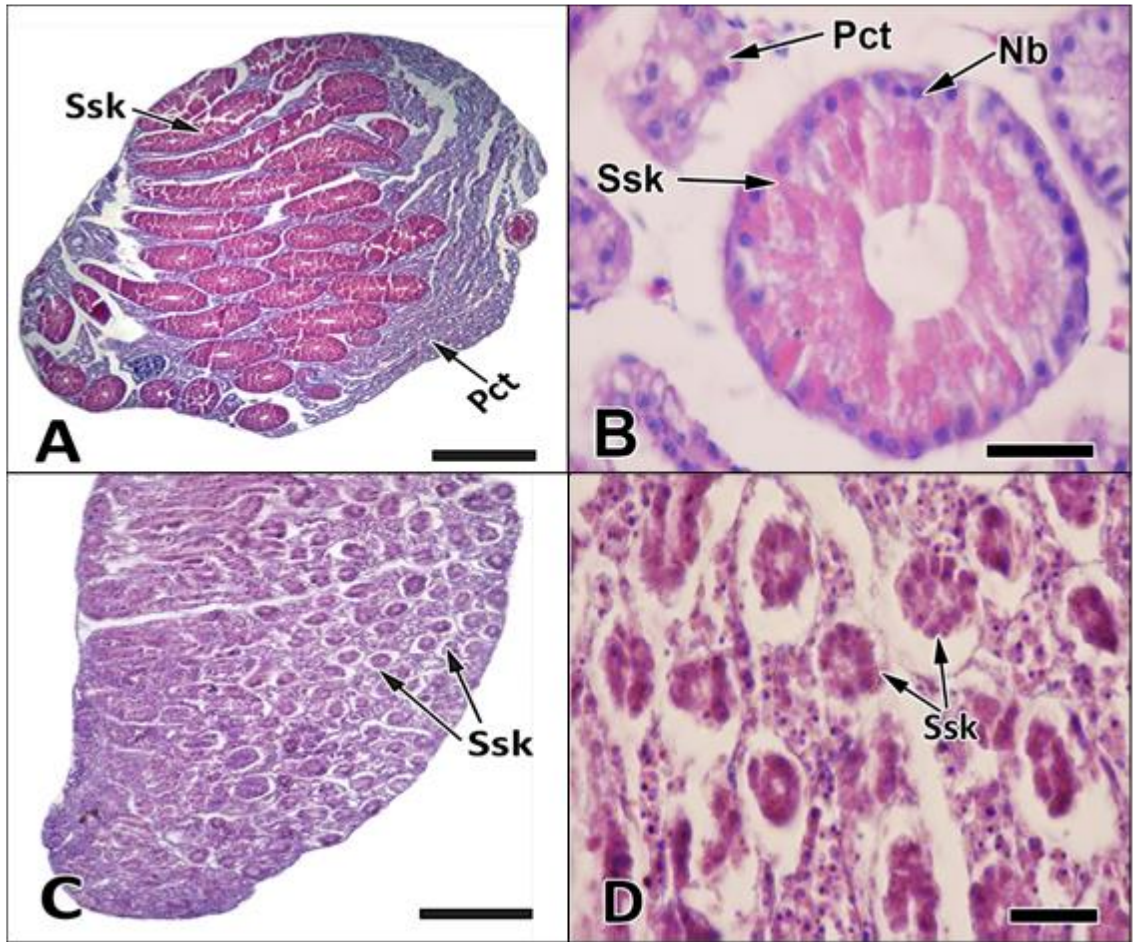


FIGURA 3.

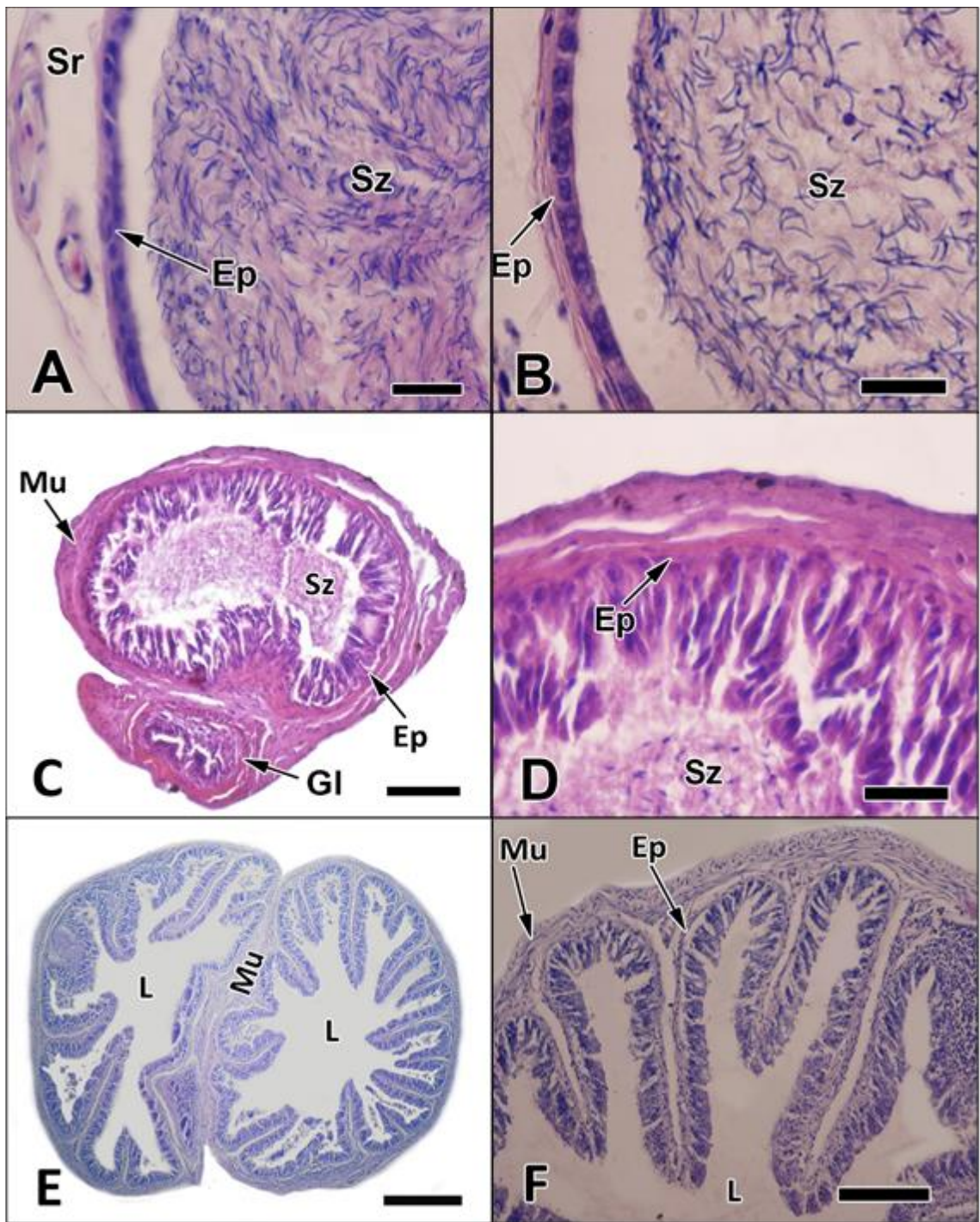


FIGURA 4.

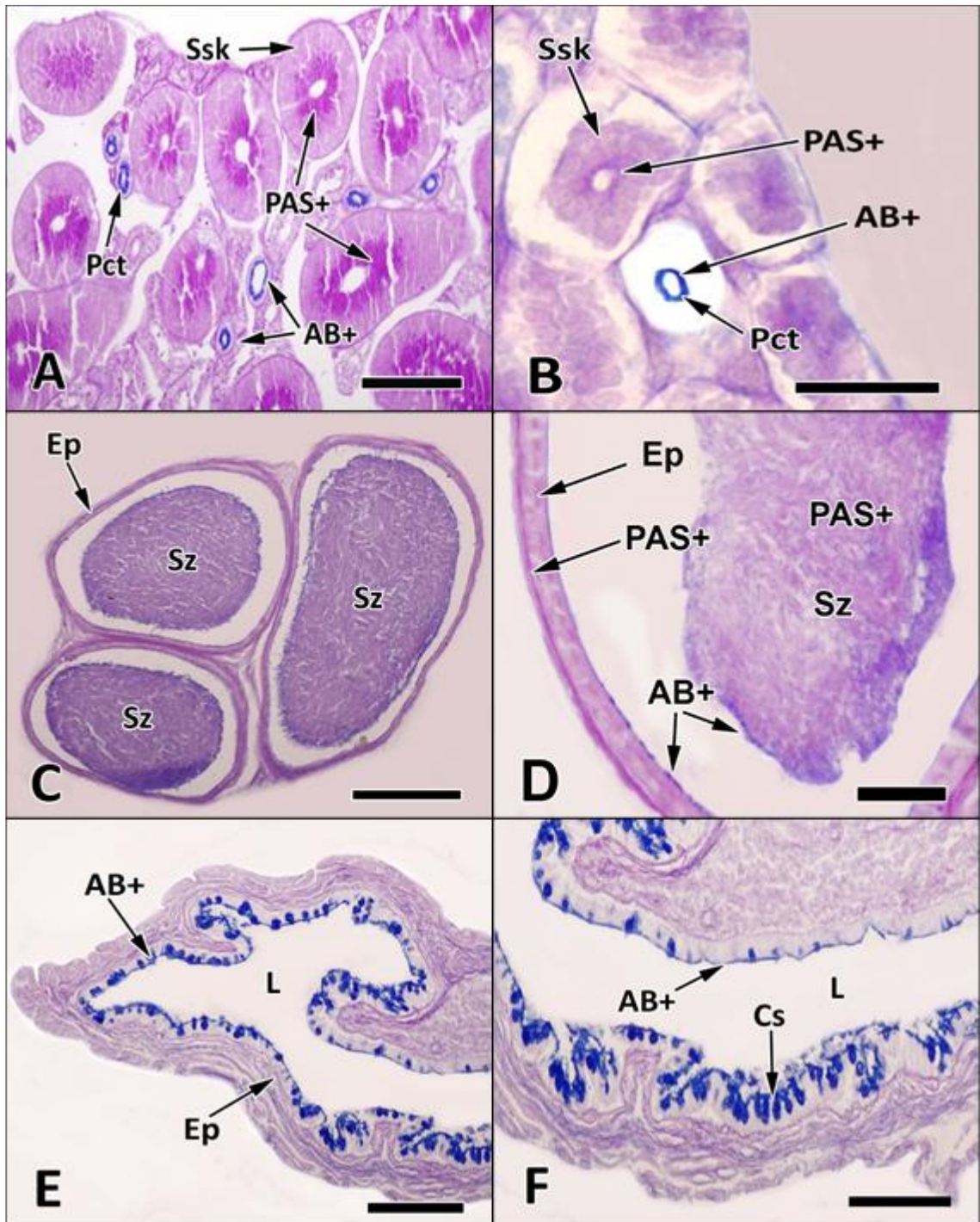


FIGURA 5.

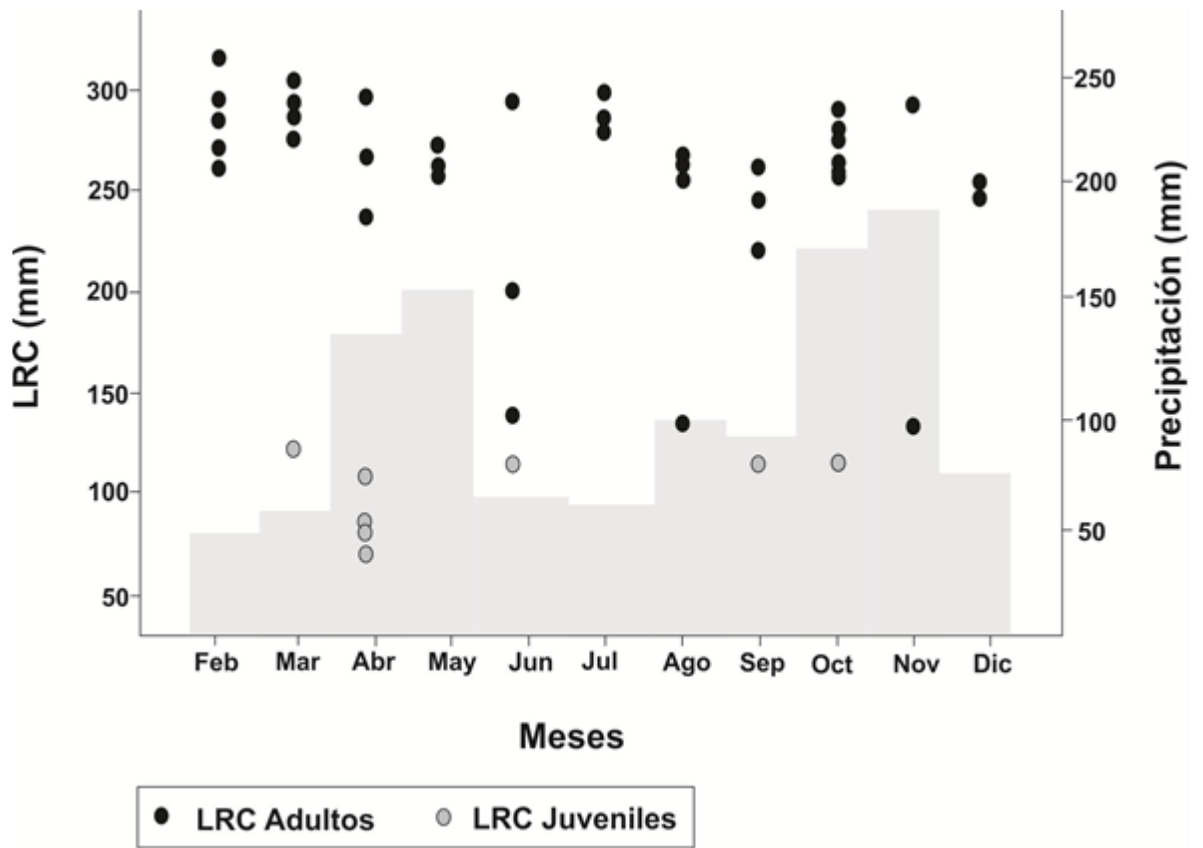


FIGURA 6.

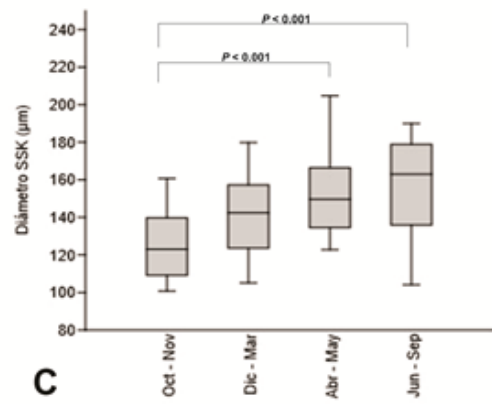
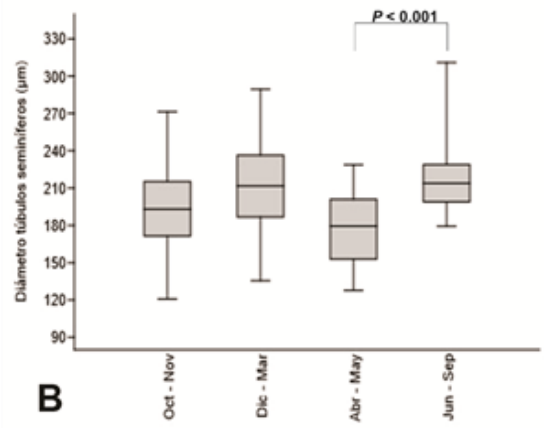
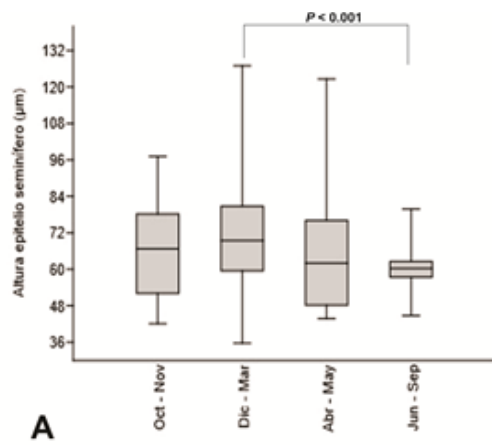


FIGURA 7.