

MORFOLOGÍA DEL OVIDUCTO Y EL OVARIO DE *Atractus* sp.  
(SERPENTES, COLUBROIDEA)

MARÍA FERNANDA CALVO CASTELLANOS

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2016

MORFOLOGÍA DEL OVIDUCTO Y EL OVARIO DE *Atractus* sp.  
(SERPENTES, COLUBROIDEA)

MARÍA FERNANDA CALVO CASTELLANOS

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**

*A Dios por ponerme en este espacio y tiempo  
A mis padres quienes han sido apoyo incondicional y educadores en todo  
momento*

*Mis hermanos, abuelos y mi particular y querida familia...*

*A Paola, Mario, en fin todos los de siempre por el ánimo, la compañía, la  
complicidad y el cariño.*

*A la profesora Martha Patricia por la oportunidad y a Elson por la idea, el tiempo,  
la ayuda y por contagiarme su pasión por las serpientes.*

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN .....	13
1. OBJETIVOS .....	15
1.1 OBJETIVO GENERAL .....	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
2. COMPETENCIAS .....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
3.1 COLECTA Y FIJACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO .....	17
3.2 MÉTODOS DE LABORATORIO .....	17
3.3 ANÁLISIS REPRODUCTIVOS .....	18
4. RESULTADOS .....	20
4.1 MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA .....	21
4.2 MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA .....	25
5. DISCUSIÓN .....	38
5.1 MORFOLOGÍA Y ACTIVIDAD SECRETORA .....	38
5.2 ALMACENAMIENTO DE ESPERMA .....	43
5.3 TAMAÑO DE LA POSTURA .....	46
5.4 ACTIVIDAD REPRODUCTIVA .....	46
6. CONCLUSIONES .....	49
BIBLIOGRAFÍA .....	50
ANEXOS .....	61

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Distribución mensual de los tamaños (LRC) de las hembras de <i>Atractus</i> sp en cada estados reproductivo. Los círculos oscuros representan las hembras del estadio pre-vitelogénico, los círculos claros son las hembras vitelogénicas I y las estrellas representan las hembras vitelogénicas II.....	20
<b>Figura 2.</b> Morfología macroscópica del tracto reproductivo de una hembra de <i>Atractus</i> sp con LRC de 290mm. A: Anterior, Cl: Cloaca, D: Derecho, F: Folículo, G: Intestino, I: Izquierdo. In: Infundíbulo, K: Riñón, Ov: Ovario, P: Posterior, U: Útero. Escala: 104mm.....	22
<b>Figura 3.</b> Diagrama general de los tractos reproductivos izquierdos en hembras de los tres estados reproductivos estudiados de <i>Atractus</i> sp .....	24
<b>Figura 4.</b> Cortes de folículos ováricos de diferentes estadios de foliculogénesis en <i>Atractus</i> sp. ....	28
<b>Figura 5.</b> Fotografías de los cortes histológicos del infundíbulo en <i>Atractus</i> sp. A. Sección transversal de infundíbulo anterior (Teñido con H&E). ....	27
<b>Figura 6.</b> Fotografías de cortes histológicos del oviducto a nivel del útero en <i>Atractus</i> sp. A detalle de una glándula uterina tubular simple perteneciente a una hembra pre-vitelogénica con presencia de esperma en el lumen (teñido con H&E).....	31
<b>Figura 7.</b> Relación entre estadios reproductivos y el promedio de la altura del epitelio glandular uterino. Los valores de las medias están representados por las líneas ubicadas dentro de las cajas, las cajas ilustran el error estándar, y los bigotes los valores máximos y mínimos.....	32
<b>Figura 8.</b> Fotografías de cortes trasversales de la zona de transición útero-vagina y vagina en <i>Atractus</i> sp. A vista general de la zona de transición entre el útero y la vagina (teñido con H&E). ....	34

**Figura 9.** Cortes transversales de cloaca, específicamente del urodeo anterior en *Atractus* sp. A corte trasversal de cloaca, en el recuadro inferior se observa el epitelio y parte de la capa muscular estriada (tinción H&E).....35

**Figura 10.** Relación entre estadios reproductivos y el promedio de la longitud rostro cloaca (LRC). Los valores de las medias están representados por las líneas ubicadas dentro de las cajas, las cajas ilustran el error estándar, y los bigotes los valores máximos y mínimos.....36

**Figura 11.** Relación entre los cuatro estadios reproductivos y los promedios del diámetro de los folículos más grandes. Los valores del diámetro del folículo más grande son valores transformados. Los valores de las medias están representados por las líneas ubicadas dentro de las cajas, las cajas ilustran el error estándar, y los bigotes los valores máximos y mínimos.....37

**Figura 12.** Relación entre los cuatro estadios reproductivos y los promedios de la longitud total del oviducto. Los valores de la longitud total del oviducto son valores transformados. Los valores de las medias están representados por las líneas ubicadas dentro de las cajas, las cajas ilustran el error estándar, y los bigotes los valores máximos y mínimos.....38

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Resultados producidos por la tinción histoquímica de Ácido Peryodico de Shiff y Azul de alcian (pH 2,5), entre estadios reproductivos de las hembras de <i>Atractus</i> sp. ....	25
<b>Tabla 2.</b> Resultados y valores de significancia de las regresiones, análisis de covarianza y ANOVA, para las variables registradas en los tractos reproductivos de las hembras de <i>Atractus</i> sp.....	36

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>Anexo A.</b> números de identificación dentro de la colección herpetológica de la Universidad Industrial de Santander de los individuos colectados.....	61

## RESUMEN

**TÍTULO:** MORFOLOGÍA DEL OVIDUCTO Y EL OVARIO DE *ATRACTUS* SP.  
(SERPENTES, COLUBROIDEA).\*

**AUTOR:** MARÍA FERNANDA CALVO CASTELLANOS\*\*

**PALABRAS CLAVES:** *Atractus* sp, infundíbulo posterior, receptáculos de esperma, transición útero vagina, madurez.

La información acerca de la reproducción de las serpientes que habitan las tierras altas de los trópicos y más aún de aquellas que poseen hábitos fosoriales es escasa. En este trabajo se describe la morfología macro y microscópica del oviducto y el ovario de *Atractus* sp, y se estudia la actividad reproductiva de la población. *Atractus* sp presenta un tracto pareado asimétrico. Los ovarios en hembras vitelogénicas muestran un número máximo de 12 folículos de diversos tamaños, estos folículos se agrupan entre sí en series de tamaños y estados de crecimiento similares. En hembras en vitelogénesis avanzada dichas series no exceden los dos folículos por ovario; así el tamaño de la postura varía entre dos a cuatro huevos. El oviducto se divide en infundíbulo, útero, zona de transición útero-vagina y vagina. El epitelio luminal de todo el oviducto muestra células ciliadas y no ciliadas con constante actividad secretora, y forma abundantes glándulas de la cáscara en la región uterina; la actividad secretora se incrementa en hembras en vitelogénesis. El almacenamiento de esperma ocurre en la zona posterior del infundíbulo, en la transición útero-vagina y en la vagina. El almacenamiento de esperma en el infundíbulo posterior ocurre en el fondo de bolsas formadas por invaginaciones del epitelio luminal y fue observado en hembras vitelogénicas. En la zona de transición útero- vagina y en la vagina se encuentran los espermatozoides en las zonas basales de los pliegues del epitelio, el cual es mayoritariamente ciliado; se observaron en hembras no vitelogénicas adultas y en vitelogénesis. El tamaño mínimo de madurez sexual fue de 216mm y durante el tiempo muestreado se encontraron hembras reproductivas permanentemente, sugiriendo una actividad reproductiva continua.

---

\* Trabajo de grado.

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Martha Patricia Ramírez Pinilla, PhD.  
Tutor: Ezequiel Gonzales León.

## ABSTRACT

**TITLE:** MORPHOLOGY OF THE OVIDUCT AND OVARY OF *Atractus* sp.  
(SERPENTES, COLUBROIDEA).\*

**AUTHOR:** MARIA FERNANDA CALVO CASTELLANOS\*\*

**KEYWORDS:** *Atractus* sp, posterior infundibulum, sperm receptacles, transition uterus-vagina sexual maturity.

It is scarce the information about the reproductive biology of the highland tropical snakes and even more if they are fossorial. This work describes the morphology of the female reproductive tract of a population of *Atractus* sp, and its reproductive activity during some months. *Atractus* sp has a paired and asymmetric tract. The vitellogenic females exhibit a maximum of 12 ovarian follicles of different sizes; these follicles are grouped in series of two follicles of similar size and growth state per ovary. Thus, the clutch size varies from two to four eggs. Histologically, the oviduct is divided in infundibulum, uterus, transition uterus-vagina, and vagina. The luminal epithelium of the entire oviduct is columnar to cuboidal with ciliated and nonciliated cells in constant secretory activity. Abundant shell glands are found in the uterus; they have increased secretory activity in vitellogenic females. Sperm storage was found in vitellogenic females in the posterior infundibulum at the bottom of sacs formed by invaginations of the luminal epithelium. Sperm was also found in adult females (vitellogenic and no vitellogenic) in the transition uterus-vagina and in the vagina, located sparse in the lumen and organized in the basal areas of epithelial folds in which the luminal epithelium is mainly ciliated. The minimum size of sexual maturity was 216 mm and during the sampling time reproductive females were ever found, suggesting a continuous reproductive activity.

---

\* Degree work.

\*\* Science Faculty, Department of Biology. Director: Martha Patricia Ramírez Pinilla, PhD.  
Tutor: Ezequiel Gonzales León.

## INTRODUCCIÓN

Las serpientes representan uno de los grupos de vertebrados más exitosos, ocupan un gran rango de latitudes, altitudes y diversos hábitats. Gracias a su amplia distribución y a sus diversos linajes evolutivos, los patrones reproductivos muestran una gran variación, dichos patrones pueden ir desde estrictamente cíclicos hasta acíclicos (Mathies, 2011) y las características de los mismos generalmente están asociadas a factores ambientales o a la historia filogenética de cada grupo (Shine, 2003).

El género *Atractus* está compuesto por pequeñas serpientes ovíparas de hábitos fosoriales y crepusculares que se encuentran ampliamente distribuidas desde Panamá hasta el norte de Argentina (Martin & Oliveira, 1993; Esqueda & La Marca, 2005). A pesar de su amplia distribución, poco se conoce sobre la biología reproductiva de las poblaciones y especies del género, y en general existe un amplio desconocimiento sobre este tema para las especies de serpientes que habitan los trópicos, y más aún para serpientes de zonas altas de la Cordillera de los Andes (Pizzantto & Marques, 2002). Igualmente aunque menos escasos, son pocos los estudios sobre reproducción en serpientes ovíparas (p. ej. SaintGirons, 1962; Aldridge, 1992; Perkins & Palmer, 1996; Goldberg, 1998; Pinto & Fernandes, 2004; Pizzatto, 2005; Santos et al., 2005; dos Santos-Costa, et al., 2006; Scartozzoni et al., 2009; Alves et al., 2014; Resende & Nascimento, 2014; Rojas, et al., 2015).

Los ciclos reproductivos en las serpientes que habitan los trópicos son muy variables; pueden ir desde estrictamente estacionales (Balestrin & Marcos, 2005; Resende & Nascimento, 2014), estacionales extendidos (Fowler et al., 1998) y continuos (Censky & McCoy, 1988). Esta variación puede ser en parte explicada por la complejidad y diversidad de climas presentes en las regiones tropicales (Pizzatto, et al., 2008). Por otra parte, se sabe que la actividad reproductiva puede

variar no sólo entre poblaciones de la misma especie, sino incluso entre sexos (Seigel & Ford, 1987), en algunas especies la ovulación no está sincronizada con el apareamiento (Barros et al., 2012); en estos casos los receptáculos especializados en almacenar esperma, desempeñan un papel importante pues aseguran la fertilización (Schuett, 1992).

En general las características macroscópicas y microscópicas del tracto reproductivo de los reptiles varían según el estado reproductivo del individuo (Perkins & Palmer, 1996; Blackburn, 1998; Goldberg, 1998; Goldberg, 2000; Pinto & Fernandes, 2004; Scartozzoni, et al., 2009; Barros, et al., 2012; Resende & Nascimento, 2014), de allí la importancia del estudio de estos órganos para el establecimiento de los patrones reproductivos. Estudios detallados sobre la morfología macro y microscópica de gónadas y ductos asociados en especies del género *Atractus* son pocos, sólo se conoce el trabajo realizado por Resende & Nascimento (2014) para *A. pantostictus*.

Esta investigación busca describir en detalle la histología y la morfología del tracto reproductivo de hembras de diferentes tamaños y estados reproductivos de una población de *Atractus* sp, haciendo énfasis en características como la adquisición de la madurez sexual, el tamaño de la postura, y la actividad secretora y la presencia de receptáculos de esperma en el oviducto. La presente investigación se encuentra enmarcada, dentro del macroproyecto desarrollado en el Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados, cuyo objetivo es describir la especie y estudiar la actividad reproductiva de machos y hembras de la población.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Describir el tracto reproductivo femenino de *Atractus* sp en individuos de diferentes tamaños y estados de madurez y actividad reproductiva.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir macroscópicamente las características morfológicas y morfométricas de ovario y oviducto de hembras juveniles y adultas de la especie.
- Determinar el tamaño corporal en el cual las hembras de *Atractus* sp alcanzan la madurez sexual.
- Estudiar la histología oviductal, describir sus características y determinar la presencia, ubicación y morfología de receptáculos almacenadores de esperma.

## 2. COMPETENCIAS

- Implementó metodologías de campo para la captura exitosa de serpientes.
- Aplicó diversas técnicas de colecta y fijación de material herpetológico.
- Reconoció las diversas características morfológicas internas y externas de la serpiente *Atractus* sp.
- Identificó, extrajo y describió las características macroscópicas del tracto reproductivo de hembras de diversos tamaños de la especie.
- Determinó el estado reproductivo en el que se encuentran las serpientes.
- Realizó exitosamente procesamiento de histotecnica para la posterior realización de cortes histológicos que permitieron hacer análisis descriptivos.
- Determinó las características variantes y constantes en el tracto reproductivo entre las hembras de diferente tamaño y condición reproductiva. Comparó y analizó los resultados en relación con la literatura en el tema.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 COLECTA Y FIJACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO**

Se realizaron 7 salidas de campo con el fin de obtener hembras de diversos tamaños de la población de *Atractus* sp. Dichas salidas se llevaron a cabo en el municipio de Santa Bárbara en el departamento de Santander (Colombia), desde octubre de 2013 hasta abril de 2014, cubriendo así meses de las estaciones húmeda y seca. Se colectaron al menos 4 individuos por mes. Las serpientes fueron llevadas al Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados de la Universidad industrial de Santander, donde se les administró una dosis letal de roxicaina al 1%, posteriormente se tomaron la longitud total (LT) y la longitud rostro cloaca (LRC), con un calibrador dial ( $\pm 0,02\text{mm}$ ). Los ejemplares se fijaron en formol al 10% y se preservaron en etanol al 70%. Finalmente fueron ingresados a la Colección Herpetológica de la Universidad Industrial de Santander. Los números de colección, correspondientes a cada individuo se incluyen en los anexos.

#### **3.2 MÉTODOS DE LABORATORIO**

Cada una de las hembras colectadas fue disecada mediante una incisión medio ventral. Se realizaron las observaciones y descripciones morfológicas a nivel macroscópico del tracto reproductivo teniendo en cuenta características como la posición, asimetría y funcionalidad de cada uno. Los individuos fueron clasificados según su condición reproductiva y madurez en hembras pre-vitelogénicas maduras y juveniles (aquellas que poseen folículos no vitelogénicos con un diámetro menor a  $> 5\text{mm}$ ), vitelogénicas I (con folículos amarillos con diámetro entre 5mm y 20mm), vitelogénicas II (con folículos amarillos de diámetro mayor a 20mm) (siguiendo a Resende & Nascimento, 2014). Se extrajo el ovario y el oviducto derecho de cada hembra, el cual en serpientes presenta mayor longitud (Blackburn, 1998; Resende & Nascimento, 2014), se registró la cantidad de

folículos ováricos, el diámetro del más grande y la longitud del oviducto (calibrador dial,  $\pm 0,02\text{mm}$ ). Ovario y oviducto se preservaron en etanol al 70%.

El oviducto se separó macroscópicamente en 3 partes que eventualmente podrían corresponder a la vagina, el útero, el infundíbulo. El ovario y las secciones del oviducto se sometieron a un proceso de deshidratación en etanol, aclaramiento en xilol, e inclusión en Paraplast (Mc Cormick®). Los segmentos del oviducto fueron seccionados transversalmente con un micrótopo rotatorio Lipshaw; los cortes de ovario y oviducto se realizaron a un grosor de  $7\mu\text{m}$ . Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina siguiendo a Luna (1968), adicionalmente se realizó una coloración con ácido periódico de Schiff (PAS) y azul de Alcian (pH 2.5). El análisis de los micropreparados se realizó con la ayuda de un microscopio Nikon H-550s® y los cortes fueron registrados con una cámara fotográfica Canon EOS®.

### **3.3 ANÁLISIS REPRODUCTIVOS**

El análisis y las comparaciones de la morfológica macro y microscópicas se realizaron con base en los trabajos de Fox (1956), Saint Girons (1962a), Aldridge (1992), Perkins & Palmer (1996), Blackburn (1998) y Siegel et al. (2011).

Se caracterizaron las hembras de los diferentes estadios (pre-vitelogénica juvenil y adulta, vitelogénica I y vitelogénica II) en el tiempo y por tamaño. Se determinó la existencia de diferencias significativas en la ocurrencia de cada categoría entre meses y estaciones climáticas utilizando la prueba de  $X^2$ .

El tamaño (LRC) mínimo con el que las hembras alcanzan la madurez sexual se estableció teniendo en cuenta la hembra más pequeña que presentó folículos vitelogénicos tardíos (Ramos-Pallares et al., 2015, 2010).

Los datos de precipitación fueron proporcionados por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia (IDEAM). Se hizo una prueba de t para determinar la existencia de diferencias significativas, entre los

valores históricos de precipitación (2005-2013), y los valores registrados para los meses en los que se llevó a cabo el estudio. Además se realizó una correlación de Spearman con la cual se evaluó la relación entre las variables morfométricas y la precipitación. La temperatura no fue evaluada pues las variaciones entre meses son mínimas.

Se examinó la relación entre el tamaño del cuerpo (LRC) y las medidas registradas en ovario (diámetro del folículo, número de folículos) y oviducto (longitud) mediante una regresión lineal. Con el objetivo de inspeccionar variaciones significativas entre meses, estaciones climáticas y estados reproductivos, y teniendo en cuenta los resultados de las regresiones, se aplicaron ANCOVAs, usando como covariante el tamaño del animal (LRC). Las variables morfológicas se transformaron para satisfacer el supuesto de normalidad y homogeneidad de varianzas. Adicionalmente se hicieron dos ANOVAs con el fin de buscar diferencias entre el LRC, los estadios reproductivos y los meses de muestreo.

Para establecer e identificar los cambios histológicos a nivel de oviducto entre estadios reproductivos se tuvo en cuenta el espesor de la capa glandular uterina, medida que fue tomada con un micrómetro ocular. Para determinar la existencia de cambios significativos entre los estados reproductivos se aplicó una prueba de Kruskal Wallis previa evaluación de los supuestos. En el caso de encontrar diferencias significativas como resultados de las pruebas, se realizó un test de rango; test de Tukey o test de Dumm, dependiendo de si los datos son o no paramétricos. Todos los análisis estadísticos fueron hechos en STATISTICA versión 7, asumiendo  $P < 0.05$  como criterio de significancia.

#### 4. RESULTADOS

Como resultados de los 7 meses de colecta se obtuvieron en total 35 hembras pertenecientes a 4 estadios reproductivos: 6 pre-vitelogénicas juveniles, 9 pre-vitelogénicas adultas, 13 vitelogénicas I y 7 vitelogénicas II. Sólo en el mes de enero (el mes más seco) no se encontraron individuos. La composición de hembras en cada estadio reproductivo en la población no mostró variaciones significativas entre meses, la presencia de hembras pre-vitelogénicas juveniles ( $\chi^2= 5,30$   $p= 0,38$ ), pre-vitelogénicas adultas ( $\chi^2=5,62$   $p= 0,34$ ), vitelogénicas I ( $\chi^2= 3,16$   $p= 0,67$ ) y vitelogénicas II ( $\chi^2= 8,52$   $p= 0,12$ ) fue constante durante el tiempo de muestreo. De igual forma, la composición de la población entre meses secos y lluviosos, no varió significativamente (pre-vitelogénico juvenil  $\chi^2= 6,55$   $p= 0,26$ ; pre-vitelogénico adulto  $\chi^2= 3,66$   $p=0,59$ ; vitelogénico I  $\chi^2= 0,78$   $p= 0,37$ ; vitelogénico II  $\chi^2= 0,53$   $p=0,46$ ). La hembra reproductiva más pequeña tenía 216 mm de LRC, y se encontraba en estadio vitelogénico I (Fig. 1). Los neonatos encontrados tenían una longitud rostro cloaca aproximada de 80 mm.

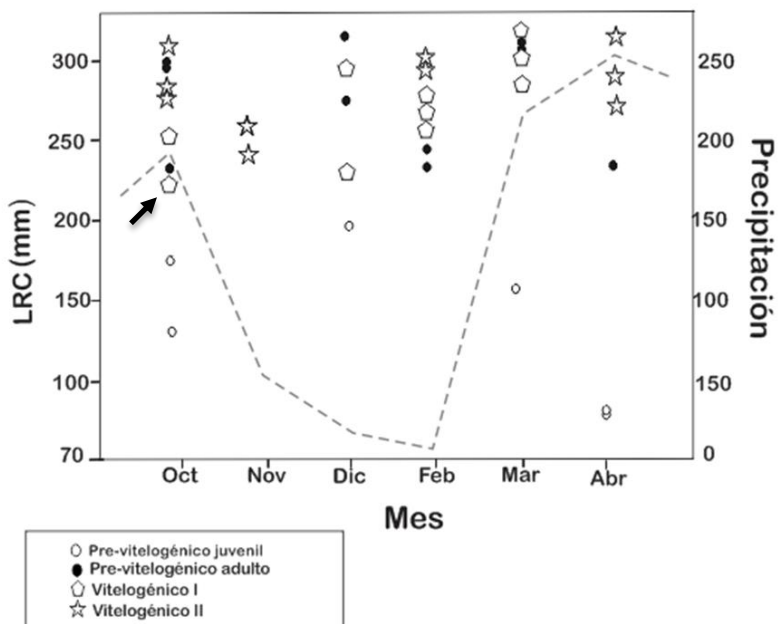


Figura 1. Distribución mensual y por picos de precipitación de los tamaños (LRC) de las hembras de *Atractus* sp.

#### 4.1 MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA

El sistema reproductivo de *Atractus* sp está compuesto por dos tractos asimétricos constituidos por un par de ovarios y un par de oviductos. Los ovarios son elongados, delgados y casi transparentes en hembras pre-vitelogénicas tanto juveniles como adultas; por otra parte, en hembras vitelogénicas I y II, los ovarios son más gruesos y resalta su color amarillento por la presencia de folículos yemados, el ovario derecho se ubica más anteriormente que el izquierdo en la cavidad abdominal (Fig.2).

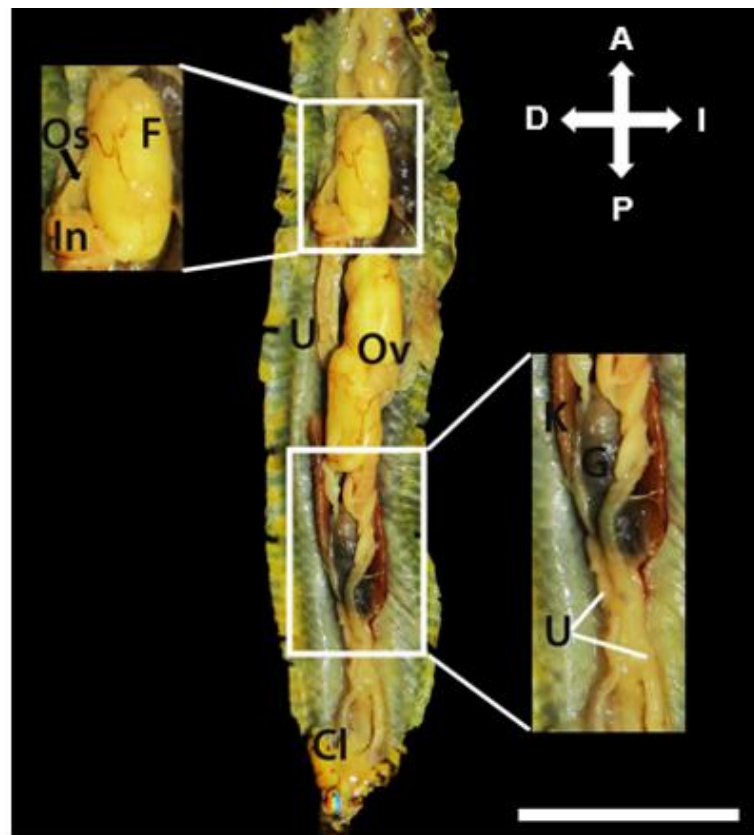


Figura 2. Morfología macroscópica del tracto reproductivo de *Atractus* sp. Escala 104mm

La morfología del ovario varía entre estadios reproductivos en cuanto al tamaño, la apariencia, el diámetro y número de folículos ováricos. De manera general los folículos en los tres estadios de las hembras adultas se presentan en series compuestas por folículos de tamaños similares, sin embargo también es posible, encontrar varios folículos aislados de menor diámetro (Fig.3). En hembras pre-vitelogénicas los folículos son pequeños y presentan una coloración transparente a pálida, el diámetro del folículo de mayor tamaño oscila entre 0,2mm y 4,6mm y su número no excede los 11 en los dos ovarios (Fig. 3a y tabla 1). Las hembras vitelogénicas I, tienen folículos con formas ovaladas más definidas, los folículos más grandes son de color amarillento, el diámetro del folículo más grande va desde 6,7 mm hasta 19 mm, y la cantidad de folículos máxima observada es de 18 (Fig. 3b y tabla. 1). En las hembras vitelogénicas II los folículos de mayor diámetro son amarillos y altamente vascularizados; presentan un diámetro entre 22,2mm y 38,5mm, y la cantidad máxima de folículos totales observada fue de 12 folículos (Fig. 2c, y tabla 1.). Las series foliculares observadas en hembras vitelogénicas II están compuestas por un número no mayor a dos folículos del mismo tamaño por cada ovario. Lo anterior sugiere que la postura de *Atractus* sp puede ser de 2 a máximo 4 huevos y coincide con las posturas observadas en campo, compuestas por un número máximo de 4 huevos.

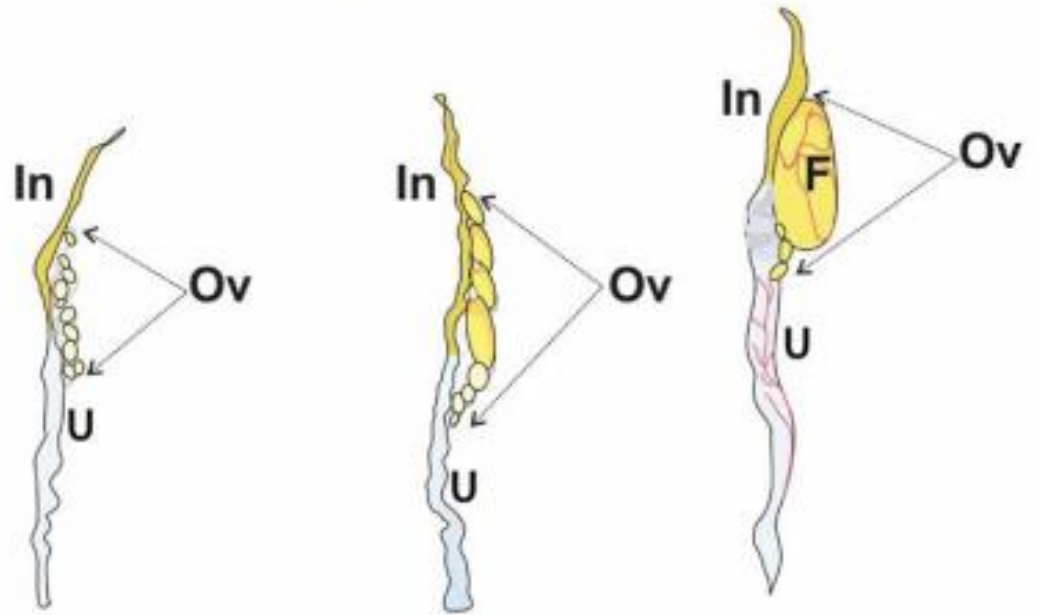


Figura 3. Diagrama general de los tractos reproductivos izquierdos en hembras de los tres estados reproductivos estudiados de *Atractus* sp. A hembra pre-vitelogénica. B hembra vitelogénica I. Escala: A 14,1mm, B 23,2mm y C 42,6 mm.

Tabla 1. Resultados y valores de significancia de las regresiones, análisis de covarianza y ANOVA, para las variables registradas en los tractos reproductivos.

Variable	Estadio reproductivo	Media o moda $\pm$ SD	Regresión	ANCOVA	ANOVA
LRC	Pre-vitelogénico juvenil	134,16 $\pm$ 34 Min=80mm, Max= 170mm			Meses P= 0,08 F= 0,68
	Pre-vitelogénico Adulto	272,81 $\pm$ 30,21 Min=228mm, Max= 307mm			Estadios P= 0,03 F= 2,83
	Vitelogénico I	272 $\pm$ 30,03 Min=216mm, Max=317mm			
	Vitelogénico II	268,71 $\pm$ 23,32 Min=240mm, Max=300mm			
Número de folículos	Pre-vitelogénico juvenil	5,16 $\pm$ 2,40 Min=3, Max= 9	$r^2=0,21$ F=10,48 P= 0,002	Meses P= 0,80 F=0,45  Temporada P= 0,54 F=0,38  Estadios P= 1,00 F= 0,32	
	Pre-vitelogénico Adulto	6,66 $\pm$ 2,36 Min=6, Max=11			
	Vitelogénico I	9 $\pm$ 3,81 Min= 4, Max= 18			
	Vitelogénico II	12 $\pm$ 2,75 Min= 6, Max= 12			
Diámetro del folículo más grande	Pre-vitelogénico juvenil	1,74 $\pm$ 0,50 Min=0,22mm,Max= 3,7	$r^2=0,082$ F= 4,14 P= 0,04	Meses P= 0,40 F=1,62  Temporada P= 0,47 F=0,53  Estadios P= 0,00001 F= 36,76	
	Pre-vitelogénico Adulto	32,35 $\pm$ 1,40 Min=1,11mm, Max= 4,65			
	Vitelogénico I	9,68 $\pm$ 3,86 Min=6,66,Max=18,9			
	Vitelogénico II	28,95 $\pm$ 6,87 Min=22,22,Max= 36,55			
Lt oviducto	Pre-vitelogénico juvenil	32,94 $\pm$ 8,92 Min=25,77mm, Max=47,45mm	$r^2=0,50$ , F=36,96, P= 0,00001	Meses P=0,76 F=0,51	
	Pre-vitelogénico	75,85 $\pm$ 9,92			

Los oviductos al igual que los ovarios muestran asimetría; el oviducto derecho es más largo que el izquierdo, sin embargo ambos son funcionales. Cada oviducto se encuentra ubicado en la cavidad abdominal, dorsolateral al intestino y al riñón y se abren de forma independiente a la cloaca. El oviducto se puede dividir en tres regiones, en la parte más anterior es posible observar una región traslúcida y plegada identificada como el infundíbulo, inmediatamente después se encuentra el útero que es un tubo más amplio y grueso y que cambia de longitud y flacidez dependiendo del estado reproductivo, finalmente y en la parte más posterior está la vagina que tiene un diámetro menor y desemboca a la cloaca (Fig. 2).

#### **4.2 MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA**

Los ovarios tienen en su región cortical los elementos funcionales, los folículos. Los lechos germinales, de donde se originan los folículos, se observan en la superficie dorsal del ovario; forman masas de tejido más gruesas que el resto de la pared del ovario y son de formas irregulares. Dentro de los lechos germinales se pueden observar agrupaciones de ovocitos desnudos, células somáticas y folículos primarios (Fig. 4a).

Los folículos previtelogénicos (Fig. 4b) se caracterizan por presentar una teca externa y una interna delgadas, separadas entre sí por pequeños vasos sanguíneos y linfáticos; la capa de la granulosa o epitelio folicular es gruesa, estratificada y polimórfica y rodea el ovocito. En el epitelio folicular se pueden distinguir tres tipos de células, pequeñas, intermedias y piriformes. Las células pequeñas se pueden encontrar en dos posiciones en el epitelio, basales o apicales. Las basales se encuentran sobre la lámina basal epitelial, y las apicales se observan hacia la zona pelúcida. Las células intermedias que son de tamaño intermedio entre las células pequeñas y las piriformes, se ubican en la porción medio-basal del epitelio. Las células piriformes se distinguen por su gran tamaño y forma característica de pera o llama, presentan un núcleo grande y tienen su

citoplasma desde la zona basal hasta la apical de la capa de la granulosa o epitelio folicular. La zona pelúcida aparece como una zona hialina que separa el epitelio y el oocito, se puede distinguir también la zona radiata. El ovocito tiene un citoplasma claro con algunas vesículas transparentes y un núcleo central grande. Los folículos vitelogénicos presentan una diferenciación más notoria entre teca interna y externa, las fibras que componen la teca son más abundantes lo cual hace que esta capa sea más gruesa. La capa de la granulosa por el contrario es una monocapa monomórfica delgada, en ella no se pueden distinguir más que un solo tipo de células epiteliales escamosas. La zona pelúcida es amplia y se puede observar claramente. En el ovocito la acumulación de gránulos de yema es notoria (Fig. 4c, d).

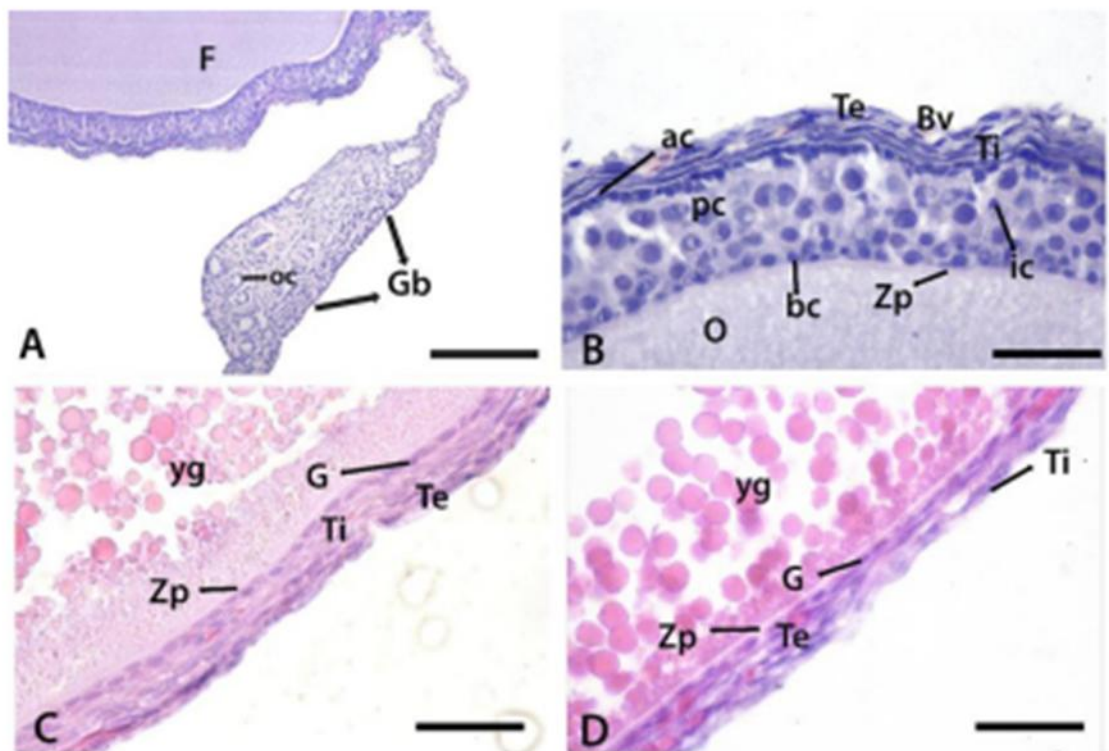


Figura 4. Cortes de folículos ováricos de diferentes estadios de foliculogénesis en *Atractus* sp. Tinción con H&E. Escala: 180µm para A, 45µm para B, C y D.

Los cortes histológicos realizados en oviductos de hembras de diferentes estados reproductivos muestran que a nivel microscópico el oviducto de *Atractus* sp se puede diferenciar en seis regiones diferentes, las cuales se describen a continuación:

El infundíbulo ubicado en la parte más anterior del ducto se caracteriza por tener paredes delgadas por una mucosa altamente plegada. Presenta un epitelio luminal cuboidal a cilíndrico con células ciliadas y no ciliadas, una lámina propia delgada aglandular, seguida por fibras delgadas de tejido muscular liso circular, tejido conjuntivo y un epitelio plano simple en su membrana serosa (Fig. 5a). El infundíbulo posterior se distingue de la zona anterior gracias a que posee paredes más gruesas y por la presencia de grandes pliegues de la mucosa. La mucosa está compuesta por un epitelio cuboidal que puede tener células ciliadas y no ciliadas y una lámina propia que es más gruesa en comparación con la porción más anterior pero es igualmente aglandular (Fig.5b, c). En el fondo de los pliegues se abren y ubican unos bolsillos que acumulan espermatozoides. Estos son conocidos como receptáculos de esperma o seminales. En ellos el epitelio luminal es cuboidal y ciliado. El esperma hallado en los receptáculos del infundíbulo posterior se observó en hembras vitelogénicas I y II. El esperma se observó asociado a los cilios y mostró una organización particular en la que las cabezas de los espermatozoides se agrupan en la parte más distal de los receptáculos.

La zona apical de las células no ciliadas del epitelio luminal del infundíbulo (anterior y posterior) y los receptáculos de esperma, reaccionaron de manera intensa en las hembras vitelogénicas I y II a la coloración de PAS. Las hembras pre-vitelogénicas mostraron una coloración positiva pero menos intensa para ambas zonas del infundíbulo (Tabla 2) (Fig.5d). Estos resultados revelan una producción de carbohidratos neutros. Adicionalmente la coloración de azul de Alcian reveló resultados igualmente positivos en las células no ciliadas del epitelio luminal, indicando producción de glicoproteínas y glicosaminoglicanos carboxilados (Fig. 5c) (Tabla 2).

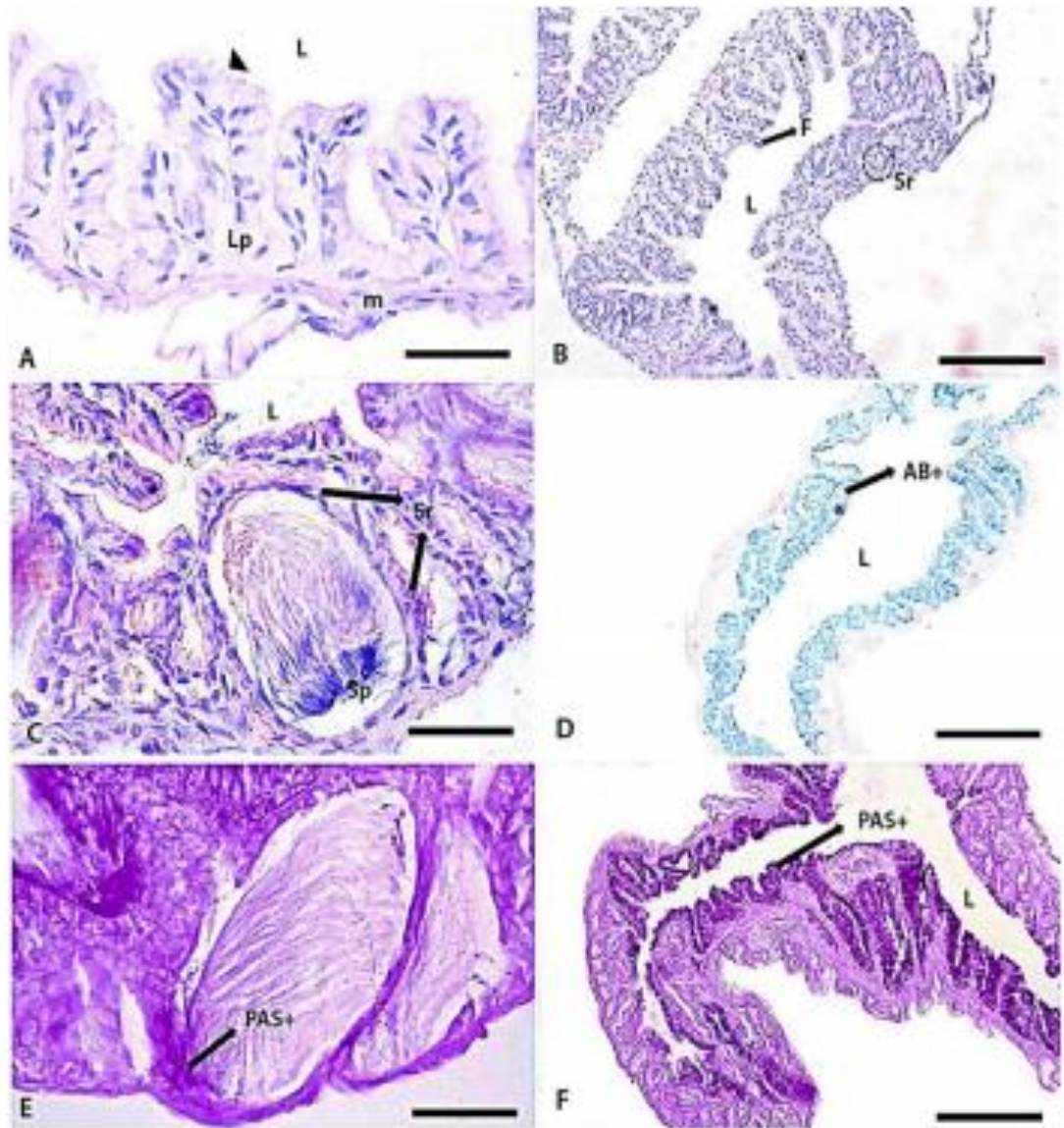


Figura 5. Fotografías de los cortes histológicos del infundibulo en *Atractus* sp. Escala: 180μm para B, D y F, 45 μm para A, C y E.

El útero tiene paredes más gruesas y está compuesto por un epitelio luminal columnar simple con células ciliadas y no ciliadas. En hembras pre-vitelogénicas el epitelio se caracteriza por ser columnar (Fig. 6a). En hembras vitelogénicas I el epitelio puede ser columnar en algunas zonas y cuboidal en otras (Fig.6b), en hembras vitelogénicas II el epitelio luminal es cuboidal y predominan las células no

ciliadas (Fig. 6c). La lámina propia está compuesta por un tejido conectivo laxo altamente vascularizado en donde se encuentra un tejido glandular altamente desarrollado. Es seguida externamente por una capa circular delgada de tejido muscular liso que está rodeada por la capa serosa, compuesta por una capa delgada de tejido conjuntivo y epitelio plano simple respectivamente (Fig. 4 e,f). El tejido glandular se caracteriza por presentar numerosas unidades secretoras de tipo tubular simple (Fig. 6a, b,c). El tejido glandular se compone de un epitelio cilíndrico simple no ciliado altamente secretor, el citoplasma de las células de hembras vitelogénicas I y II contiene abundantes gránulos eosinófilos. La actividad secretora de estas glándulas produce cambios en el grosor de la lámina propia entre hembras de diferentes estadios reproductivos. Las glándulas uterinas de hembras pre-vitelogénicas se caracterizan por tener un epitelio glandular con células cúbicas no secretoras y un lumen amplio (Fig.6d). Las unidades tubulares secretoras se rodean de un tejido conjuntivo laxo altamente vascularizado. La lámina propia de las hembras vitelogénicas I, muestra un mayor grosor debido a un aumento en el desarrollo de las unidades glandulares, las cuales tienen células columnares que producen abundantes gránulos de secreción eosinófilos y un lumen más reducido (Fig.6e). En las hembras vitelogénicas II el tejido glandular es grueso, con células epiteliales columnares conteniendo muchos gránulos de secreción, el lumen es bastante reducido (Fig.6f). El espesor de la capa glandular mostró diferencias significativas entre estadios (Kruskal Wallis;  $H= 13,46$   $P= 0,003$ ), las diferencias se presentan entre las hembras vitelogénicas II y el resto de los estadios, al igual que entre las hembras pre-vitelogénicas juveniles, y las hembras vitelogénicas I (test de Dunn  $P < 0.05$ ) (Fig. 7).

Las células no ciliadas del epitelio luminal uterino fueron positivas a las tinciones de Alcian Blue y PAS (Fig. 6g, h) (Tabla 2). La reacción a la tinción de PAS fue intensa para las hembras de los tres estadios reproductivos con presencia de esperma, y hembras vitelogénicas II. Las glándulas uterinas por su parte, reaccionaron negativamente. Por último la presencia de esperma en el lumen de

esta porción del oviducto fue evidente en todas hembras adultas independientemente de su estado reproductivo.

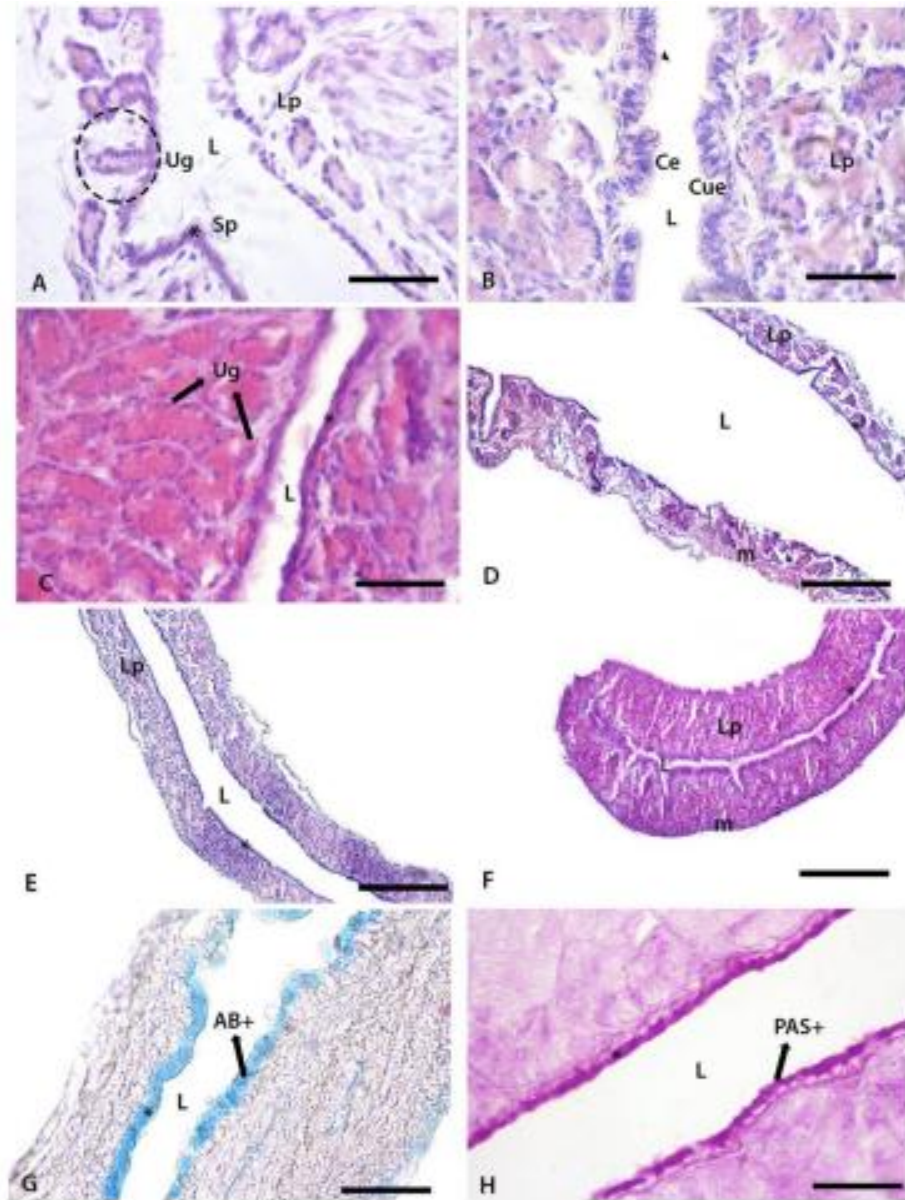


Figura 6. Fotografías de cortes histológicos del oviducto a nivel del útero en *Atractus* sp. Escala: 180µm para A y B, 45µm para C, D, E, F.

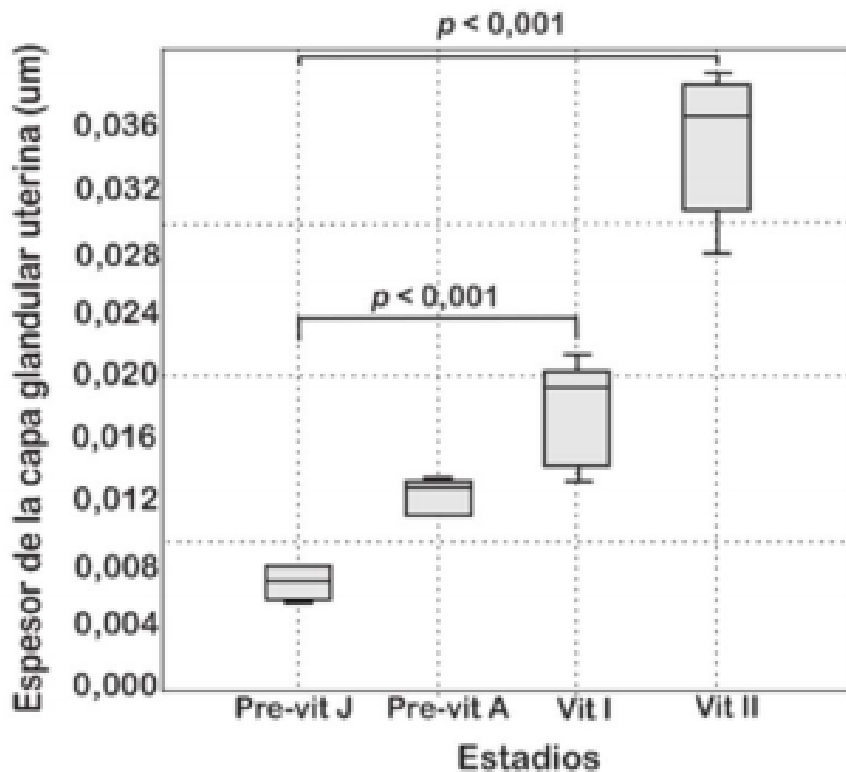


Figura 7. Relación entre estadios reproductivos y el promedio de la altura del epitelio glandular uterino.

La zona de transición entre el útero y la vagina presenta gran cantidad de pliegues que se ramifican en pliegues secundarios. El epitelio luminal de esta porción es columnar simple y ciliado en su mayoría, la lámina propia es delgada, aglandular y está rodeada por una capa de tejido muscular liso circular que se caracteriza por ser más gruesa en comparación con zonas anteriores, y finalmente se observa la capa serosa (Fig.8a). En la base de los pliegues longitudinales se observó acumulación de esperma, de igual manera se observó esperma en el lumen del ducto. Las estructuras ubicadas en la base de los pliegues son llamadas criptas (Fig. 8b).

La vagina tiene una forma circular definida con una capa muscular lisa circular bastante gruesa que le confiere la apariencia de un esfínter. Esta sección presenta largos pliegues de la mucosa que tienen a su vez pequeños pliegues secundarios.

El epitelio que reviste los pliegues es columnar simple ciliado, la lámina propia es delgada y aglandular y está rodeada por la capa circular gruesa de tejido muscular liso, tejido conectivo y epitelio plano simple que componen la capa serosa (Fig. 8c). Adicionalmente se observó en la base de los pliegues, criptas profundas con epitelio luminal ciliado ubicadas en la base de los pliegues (Fig. 8c, d) en las que se pudo evidenciar la presencia de esperma. El esperma encontrado en esta parte del oviducto no sólo se restringe a dichas estructuras sino que también fue posible verlo en el lumen y entre los cilios de los pliegues secundarios (Fig. 8e). El esperma almacenado en las criptas de la transición útero-vagina y vagina se organiza en grupos, en los cuales las cabezas de los espermatozoides se dirigen hacia los cilios del epitelio y sus colas hacia el lumen (Fig. 8d). El esperma en la transición útero-vagina y en la vagina se presentó en hembras adultas de los 3 estadios reproductivos estudiados durante los seis meses de colecta, siendo más abundante en la vagina. Las células no ciliadas del epitelio luminal de la transición útero-vagina y de la vagina reaccionaron de forma positiva e intensa a la coloración de PAS. Por el contrario la coloración de azul de Alcian fue débilmente positiva para todas las hembras (Fig. 8f) (Tabla 2).

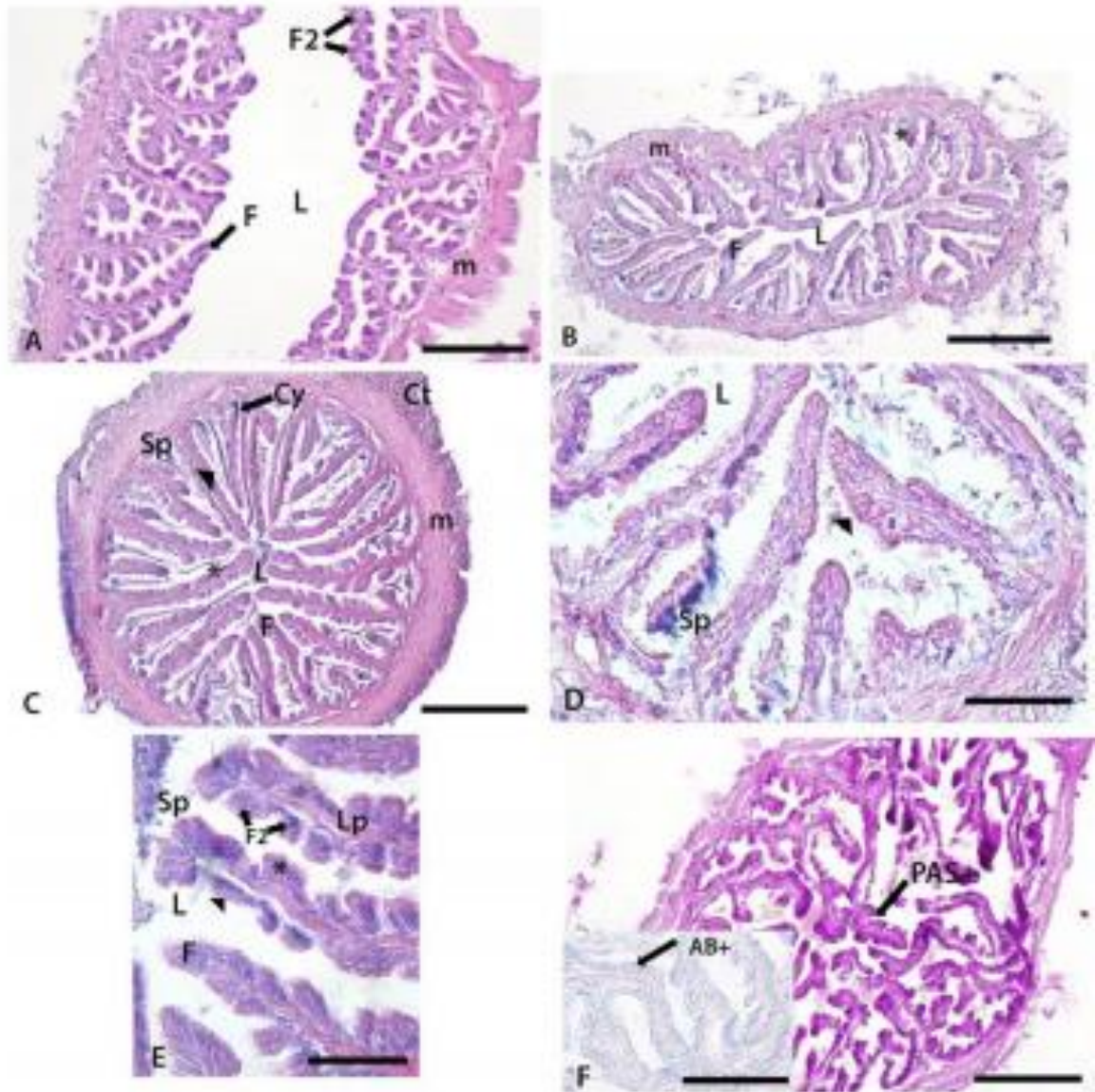


Figura 8. Fotografías de cortes trasversales de la zona de transición úterovagina y vagina en *Atractus* sp.

De manera adicional se obtuvieron cortes de cloaca de las hembras de *Atractus* sp. Esta porción presenta varios pliegues grandes, cubiertos por un epitelio estratificado columnar bastante alto con núcleos basales, una luz amplia, una lámina propia gruesa, una capa de musculo liso circular y una de músculo esquelético estriado (Fig.9a,b). La zona apical del epitelio produce grandes

cantidades de gránulos secretores los cuales fueron positivos para PAS y AB para todos los estadios reproductivos (Fig. 9c, d) (Tabla 2).

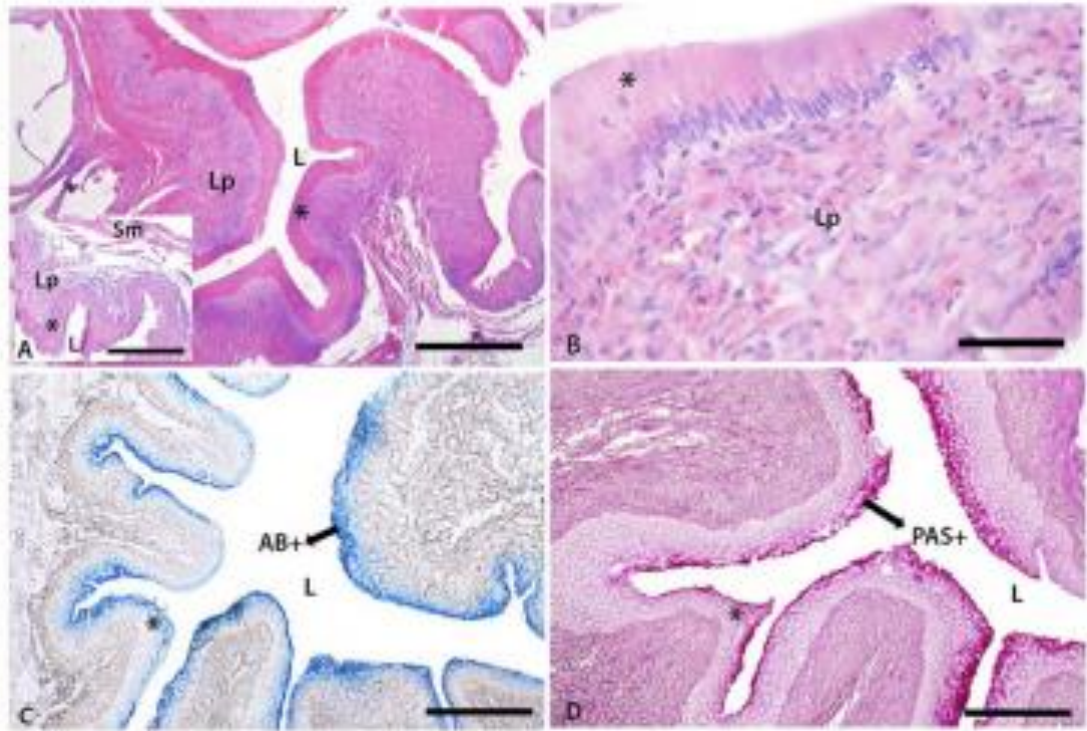


Figura 9. Cortes transversales de cloaca, específicamente del urodeo anterior en *Atractus* sp.

Tabla 2. Resultados producidos por la tinción histoquímica de Ácido Peryodico de Schiff y Azul de alcian. + débilmente positivo, ++ fuertemente positivo.

Estadio reproductivo	Tinción	Infundibulo anterior	Infundibulo posterior	Útero	Unión útero-vagina	Vagina	Cloaca
Pre-Vitelogénica juvenil	PAS	+	+	+	+	+	++
	AB	+	+	+	+	+	++
Pre-Vitelogénica adulta	PAS	+	+	++	++	++	++
	AB	+	+	+	+	+	++
Vitelogénica I	PAS	++	++	++	++	++	++
	AB	++	++	++	+	+	++
Vitelogénica II	PAS	++	++	++	++	++	++
	AB	++	++	++	+	+	++

La LRC no presentó variaciones entre meses, pero si entre estadios reproductivos; estas variaciones se observan entre las hembras pre-vitelogénicas juveniles y las hembras adultas pre-vitelogénicas, vitelogénicas I y II (test de Tukey;  $P < 0.05$ ) (Tabla 1) (Fig. 10).

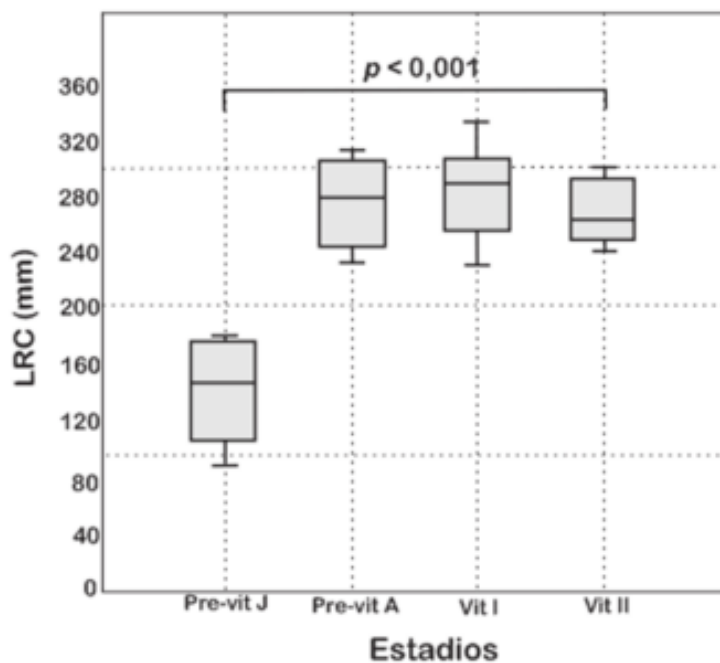


Figura 10. Relación entre estadios reproductivos y el promedio de la longitud rostro cloaca (LRC).

El número de folículos en desarrollo, el diámetro del folículo más grande y la longitud total de oviducto mostraron una relación con la LRC. Estas variables no mostraron variaciones significativas entre meses ni entre las temporadas de lluvia o seca. De igual forma no se encontraron diferencias entre el número de folículos y los diferentes estadios reproductivos. Sí hubo variaciones significativas entre el diámetro del folículo más grande y la longitud de oviducto, con respecto a los estadios reproductivos. Las diferencias obvias en el diámetro del folículo más grande se dan entre las hembras pre-vitelogénicas juveniles y adultas, respecto de las hembras vitelogénicas (Fig. 11). Las diferencias para la longitud total de del oviducto se presentan entre los individuos pre-vitelogénicos juveniles y las hembras maduras de los otros tres estadios restantes (test de Tukey;  $P < 0.05$ ) (Tabla 1) (Fig. 12).

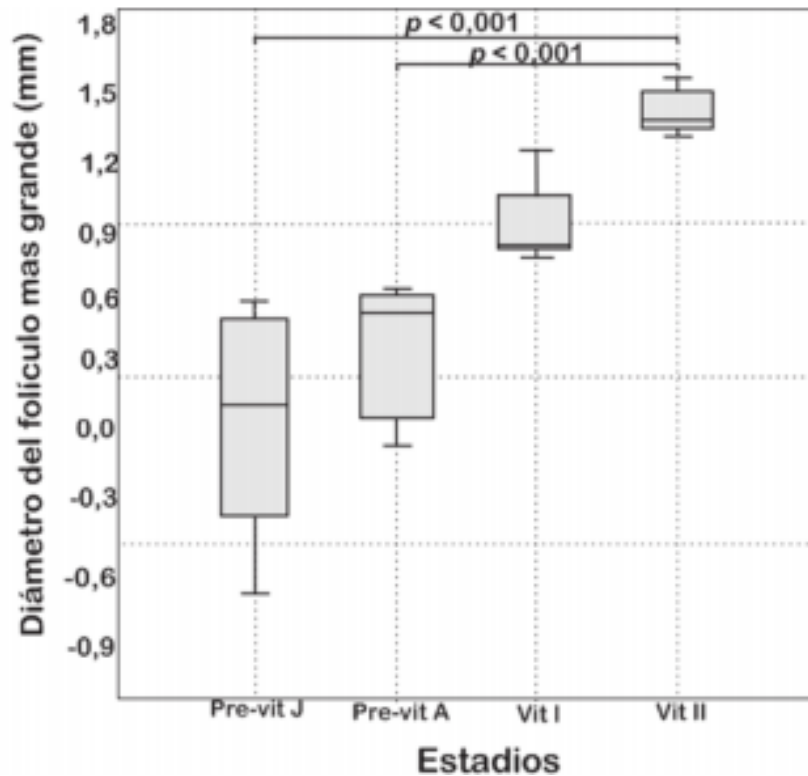


Figura 11. Relación entre los cuatro estadios reproductivos y los promedios del diámetro de los folículos más grandes.

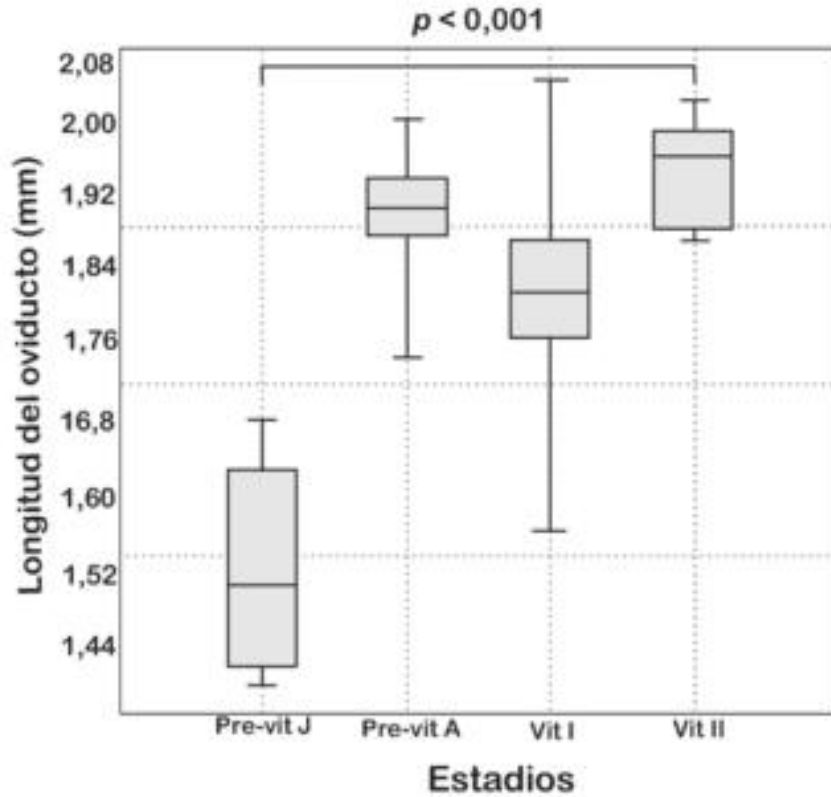


Figura 12. Relación entre los cuatro estadios reproductivos y los promedios de la longitud total del oviducto.

No se encontraron diferencias entre los datos históricos de precipitación, y los registrados para los meses del muestro ( $t= 0,19$ ,  $P= 0,84$ ). Tampoco se encontró relación entre las variables morfológicas reproductivas y los valores de precipitación (Spearman, número de folículos  $R= 0,23$   $P= 0,31$ ; Diámetro del folículo más grande  $R=0,46$   $P=0,12$ ; longitud del oviducto  $R= 0,17$   $P= 0,11$ ).

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 MORFOLOGÍA Y ACTIVIDAD SECRETORA

La morfología macroscópica de los tractos reproductivos femeninos descrita para *Atractus* sp sigue el patrón reportado para la mayoría de los escamados (Fox, 1956; Blackburn, 1998; Server & Ryan, 1999; Girling, 2002). Se resalta la asimetría en la longitud de los oviductos, siendo el derecho generalmente más largo. Esta característica común en serpientes de cuerpo elongado estaría relacionada con la optimización del espacio intraabdominal durante la gravidez (Perkins & Palmer, 1996).

La histología del ovario y la observación del proceso de foliculogénesis muestran que en general se comparten las características encontradas para otras especies de escamados (Lance & Lofts, 1978; Uribe, et al., 1995; Gómez & Ramírez-Pinilla, 2004). Las características observadas en el lecho germinal de *Atractus* sp, coinciden con las descritas para varias especies de lagartos y serpientes (Lance & Lofts, 1978; Klosterman, 1983; Uribe, et al., 1995; Gómez & Ramírez-Pinilla, 2004). No pudimos determinar el número de lechos germinales presentes en esta especie. En serpientes, este número puede variar y ser más amplio que en lagartos, esto probablemente, gracias a que las serpientes poseen un cuerpo y un ovario más elongado (Radder, et al., 2008; Guraya, 2013).

El cambio más evidente entre los folículos pre-vitelogénicos y vitelogénicos se observó no sólo en la acumulación de yema y en el aumento del tamaño de los folículos, sino en el grosor y composición de la capa granulosa. Estos cambios coinciden con lo encontrado por otros varios autores en escamados (p.ej. Lance & Loft, 1978; Uribe et al., 1995). La capa granulosa en los folículos previtelogénicos se caracteriza por ser polimórfica y gruesa, en ella sobresalen las células

piriformes, las cuales se cree cumplen una función fundamental en el crecimiento del oocito, pues servirían como transportadoras de materiales citoplasmáticos (Betz, 1963; Goldberg, 1970; Uribe et al., 1995). Al no encontrar hembras grávidas en este muestreo, no se pudo describir el cuerpo lúteo, el cual es un elemento funcional endocrino muy importante en reptiles.

La zonación del oviducto encontrada por histología en *Atractus* sp coincide con lo reportado para la mayoría de escamados ovíparos (SaintGirons, 1962a; Aldridge, 1982; Guillette & Jones, 1985; Adams & Cooper JR, 1988; Perkins & Palmer, 1996; Resende & Nascimento, 2014; Rojas, et al., 2015). No obstante se presentan algunas diferencias en cuanto a la nomenclatura utilizada por los diferentes autores.

El infundíbulo fue dividido en dos porciones, anterior y posterior. El infundíbulo anterior que inicia con el ostium infundibular, tiene como función recibir el ovocito recién ovulado (Girling, 2002), el epitelio de esta zona es ciliado y plegado. La abundancia de cilios se relaciona con el traslado del ovocito recién ovulado hacia la parte posterior, lugar donde se efectúa la fertilización (Blackburn, 1998). El infundíbulo posterior se caracteriza principalmente por ser un tubo más grueso y estrecho, y por la presencia de los receptáculos de esperma, los cuales han sido observados en esta misma zona en muchas otras serpientes tanto ovíparas como vivíparas (Saint Girons, 1962a; Fox, 1956; Halpert, et al., 1982; Aldridge, 1982; Perkins & Palmer, 1996; Sever, et al., 2000; Server & Hamlett, 2002; Yamanouyea, et al., 2004; Siegel & Server, 2008; Siegel et al., 2009; Resende & Nascimento, 2014; Rojas, et al., 2015).

Aldridge (1982) describe esta porción del oviducto en *Tantilla coronata* como zona de unión infundíbulo-útero, la cual se caracteriza por la presencia de receptáculos de esperma de tipo alveolar. Esta morfología de los receptáculos coincide con lo reportado para otras serpientes ovíparas como *Diadophis punctatus* (Perkins &

Palmer, 1996), pero difiere con lo descrito para *Cerastes cerastes*, *Philodryas patagoniensis* y *Atractus pantostictus*, en donde los receptáculos son tipo tubulares (SaintGirons, 1962a; Resende & Nascimento, 2014; Rojas, et al., 2015), lo cual corresponde con lo aquí descrito para *Atractus* sp.

El útero en especies ovíparas tiene una de las funciones más importantes, producir los componentes de la cáscara de los huevos y retenerlos hasta el momento de la oviposición (Perkins & Palmer, 1996; Blackburn, 1998; Girling, 2002). Histológicamente el útero muestra gran variación, esto gracias a las múltiples veces que ha evolucionado los modos reproductivos en los escamados (Blackburn, 1998; Siegel, et al., 2011). Un ejemplo de dicha variación se da en la morfología de las glándulas uterinas, encargadas de la producción de la cáscara, las cuales varían tanto entre especies ovíparas como vivíparas (Heulin, et al., 2005). Las glándulas uterinas en *Atractus* sp, son tubulares simples al igual que lo descrito para otras serpientes ovíparas como *Cerastes cerastes*, *Coniophanes fissidens*, *Crotalus viridis*, *Natrix natrix*, *Vipera aspis* y *Philodryas patagoniensis* (Siegel, et al., 2011; Rojas, et al., 2015), pero difieren con lo reportado para *Tantilla coronata* y *Diadophis punctatus*, donde las glándulas son descritas como alveolares (Aldridge, 1982; Perkins & Palmer, 1996).

El epitelio luminal que recubre el útero en *Atractus* sp, presenta una serie de variaciones teniendo en cuenta el estadio reproductivo de la hembra analizada. Dicho epitelio puede ser cilíndrico o cúbico, y la cantidad de células ciliadas disminuye conforme aumenta la actividad reproductiva; esta misma observación se ha hecho en otras especies como *Cerastes cerastes* (SaintGirons, 1962a) y podría estar relacionada con el aumento de la actividad secretora por parte del epitelio luminal uterino en hembras de estadios reproductivos avanzados. El aumento de dicha actividad por parte del epitelio luminal produce gránulos secretores proteicos que estarían relacionados con el proceso de producción de la membrana de la cáscara (Hoffman, 1970).

El incremento de la altura del epitelio glandular del útero es evidente en hembras de *Atractus* sp en el estadio vitelogénico II, esto coincide con lo encontrado para la mayoría de los escamados ovíparos, y se debe a un aumento en la actividad del tejido glandular (Heulin, et al., 2005). Dicho aumento está relacionado, con la gran producción de gránulos secretores que formarán la porción proteica de la cáscara del huevo por parte de las glándulas uterinas de hembras vitelogénicas II y estaría controlado por un incremento en la producción de estrógenos, como se ha descrito para otras serpientes como *Thamnophis elegans* (Mead et al., 1981).

Para la sección más posterior del oviducto, la nomenclatura es muy diversa y varía ampliamente entre autores. Ha sido llamada vagina (Perkins & Palmer, 1996; Blackburn, 1998; Uribe et al., 1998; Sever, et al., 2000), vagina anterior (Fox, 1956; Halpert, et al., 1982), bolsa (Resende & Nascimento, 2014), tubo vaginal (SaintGirons, 1962a), útero posterior (Aldridge, 1992), útero no glandular (Siegel & Server, 2006; Siegel & Server, 2008; Resende & Nascimento, 2014) y más recientemente unión útero-vagina y vagina (Rojas et al., 2015). La nomenclatura propuesta aquí coincide con la descrita por Rojas et al. (2015) para *Philodryas patagoniensis*, en donde se realiza la zonación teniendo en cuenta la funcionalidad y las características de cada porción.

En general la histología descrita para estas secciones, es similar a la reportada por otros autores para los escamados (Fox, 1956; Adams & Cooper JR, 1988; Perkins & Palmer, 1996; Uribe et al., 1996; Blackburn, 1998; Girling, 2002; Sánchez-Martínez, et al., 2007; Siegel & Server, 2008; Siegel, et al., 2011). La transición útero–vagina se diferencia morfológicamente del útero por la ausencia de glándulas, la presencia de largos pliegues y un aumento en el grosor de la capa muscular. En cuanto a la funcionalidad de esta parte, en el útero se retienen los huevos durante la gestación y se fabrica la cáscara de los mismos (Blackburn, 1998; Girling, 2002). Por el contrario en la transición útero-vagina funciona como

sitio de almacenamiento de esperma, y como canal de entrada a la vagina (Rojas, et al., 2015).

La vagina se caracteriza por tener una capa muscular mucho más gruesa que el resto del oviducto, esta funciona como esfínter y sirve para la retención de los huevos y el movimiento de los mismos durante la oviposición (Perkins & Palmer, 1996).

La actividad secretora del epitelio luminal del oviducto es constante en los tres estadios encontrados de las hembras adultas, las variaciones se presentan en la intensidad de la reacción, siendo ésta mayor en estados vitelogénicos. Dicha intensidad podría estar también relacionada con la presencia de esperma en algunas zonas del oviducto (Resende & Nascimento, 2014) pues como se ha reportado por Uribe et al. (1998) y Siegel et al. (2009), las secreciones que se observan en el tracto de las hembras con presencia de esperma son similares a las producidas por el segmento sexual renal de los machos. Por otra parte, la constante secreción del epitelio luminal a lo largo del tracto, incluida la cloaca en los cuatro estadios reproductivos, podría estar involucrada en la protección del tracto hacia posibles microorganismos, además podría servir como lubricación, y así evitar la pérdida de humedad (Carneiro & Junqueira, 2008; Rojas et al., 2015).

La actividad secretora de las células no ciliadas del infundíbulo anterior fue constante en las hembras de los cuatro estadios reproductivos. Se ha encontrado que la secreción en esta porción del infundíbulo es intensa e ininterrumpida durante todo el ciclo reproductivo (Siegel & Server, 2008). Dichas secreciones estarían relacionadas con la deposición de materiales importantes al huevo recién ovulado (Girling, 2002). Por otra parte, en el infundíbulo posterior la presencia de mucopolisacáridos y carbohidratos neutros aumenta en hembras vitelogénicas I y II. La presencia de esperma parece propiciar el aumento de dichas secreciones,

las cuales servirían para la nutrición y la protección del esperma alojado en los receptáculos de esperma (Halpert et al., 1982).

En el útero, la actividad secretora aumenta conforme avanza la actividad reproductiva de las hembras. El epitelio uterino de las hembras vitelogénicas I y II de *Atractus* sp reacciona de manera positiva e intensa a la tinción de azul de alcian, la cual detecta glicosaminoglicanos, sustancia que hace parte de los componentes de la cáscara (Heulin, et al., 2005). La principal fuente de secreción proteica para la producción de la cáscara, son las glándulas uterinas (Cree et al., 1996). En *Atractus* sp, las glándulas uterinas no reaccionaron de manera positiva a la tinción de azul de alcian, hecho que ha sido observado en otros escamados (Heulin, et al., 2005), por lo tanto la intensidad de la reacción en las hembras cercanas a la ovulación a nivel del epitelio uterino, se relacionaría con la producción de los componentes específicos y propios de la cáscara del huevo.

La baja intensidad de la reacción histoquímica de AB en la transición útero-vagina y vagina en todas las hembras procesadas sería explicada por la ausencia de hembras grávidas cercanas a la ovoposición, en nuestro muestreo. Se sabe que las hembras grávidas, presentan un aumento en la concentración de glicosaminoglicanos en la vagina, y que dicho aumento es un indicio de que las hembras están próximas a la ovoposición (Perkins & Palmer, 1996).

## **5.2 ALMACENAMIENTO DE ESPERMA**

En general se conocen dos sitios de almacenamiento de esperma en los escamados, el infundíbulo y la parte más posterior del tracto reproductivo (Fox, 1956; Saint Girons, 1962a; Saint Girons, 1962b; Hoffman, 1970; Halpert et al., 1982; Aldridge, 1992; Perkins & Palmer, 1996; Server & Hamlett, 2002; Rojas et al., 2015). En *Atractus* sp el almacenamiento de esperma se observó en el infundíbulo posterior y en la transición útero-vagina y vagina. En el infundíbulo posterior de *Atractus* sp los receptáculos de esperma son invaginaciones

epiteliales tubulares ciliadas, que en otras especies han sido descritas como alveolares o tubulares (Aldridge, 1992; Server & Ryan, 1999; Server & Hamlett, 2002; Resende & Nascimento, 2014; Rojas, et al., 2015). Para serpientes neotropicales los receptáculos de esperma en el infundíbulo han sido descritos para *Bothrops erythromelas*, *Atractus pantostictus* y *Philodryas patagoniensis* (Barros, et al., 2014; Resende & Nascimento, 2014; Rojas et al., 2015), sin embargo sólo se confirmó el almacenamiento de esperma para *Philodryas patagoniensis* pues no se encontró evidencia de esperma dentro de las estructuras en las otras especies. Lo anterior convierte a *Atractus* sp en el segundo reporte confirmado de una especie Neotropical que almacena esperma en receptáculos seminales del infundíbulo posterior.

Por otra parte, en la transición útero vagina y en la vagina el esperma se observó acumulado en criptas, que se ubican en la base de los pliegues longitudinales del epitelio luminal. Estas criptas parecen ser extensiones del revestimiento del oviducto y podrían no estar especializadas en guardar esperma, condición que ha sido reportada para otros reptiles (Sánchez-Martínez et al., 2007). La considerable cantidad de esperma observada en estas zonas y en el lumen de útero, transición útero-vagina y vagina en hembras adultas de *Atractus* sp, podría ser indicio de un apareamiento reciente (Siegel & Server, 2006) y no de su almacenamiento. Por otra parte, la presencia de esperma en dichas criptas, se observó en hembras adultas de tres estadios reproductivos; pre-vitelogénico, vitelogénico I y II. En serpientes el momento en el cual las hembras son receptivas a los machos está asociado al aumento en la producción de estrógeno por parte del ovario, adicionalmente, el aumento de estrógeno está involucrado en la fabricación de vitelogenina, la cual estimula el crecimiento de los folículos ováricos (Crews & Garstka, 1982; Mendonca & Crews, 1996). Sin embargo, se ha observado en otras especies de serpientes altamente estacionales en su reproducción como *Seminatrix pygaea* y *Thamnophis sirtalis parietalis*, presencia de esperma y evidencia de receptividad en hembras no vitelogénicas. Este hecho estaría

relacionado con un posible desacoplamiento de la conducta reproductiva de receptividad y la foliculogénesis, e implica la necesidad de almacenar los espermatozoides hasta la ovulación unos meses más tarde (Server & Ryan, 1999; Whittier & Crews, 1986).

La intensa reacción al reactivo de PAS de los receptáculos de esperma con espermatozoides en su interior, podría ser explicado según Siegel et al. (2011) a la capacidad que tienen estos receptáculos de secretar gránulos ricos en hidratos de carbono neutros, que atraerían al esperma a los receptáculos, esto sumado a las secreciones propias del esperma aumentarían la intensidad de la reacción histoquímica (Adams & Cooper JR, 1988).

El esperma acumulado tanto en el infundíbulo, transición útero-vagina y vagina mostró una organización particular, las cabezas del esperma se orientan hacia la parte distal de los receptáculos. Este patrón de organización ha sido observado en otros escamados (Fox, 1956; Halpert, et al., 1982; Adams & Cooper JR, 1988; Aldridge, 1992; Perkins & Palmer, 1996; Siegel, et al., 2011; Rojas, et al., 2015) y podría deberse a algún tipo de mecanismo químico que propicia dicha organización (Adams & Cooper JR, 1988). Este ordenamiento particular tendría algún valor funcional, como la protección física del esperma o la reducción de la actividad metabólica del mismo (Fox, 1956; Halpert, et al., 1982; Adams & Cooper JR, 1988). La función de estas estructuras tanto en el infundíbulo, en la transición útero-vagina y vagina, parece ser proteger de forma mecánica el esperma (Aldridge, 1992; Server & Ryan, 1999) y su nutrición (Halpert et al., 1982).

A pesar de que se desconoce la cantidad de tiempo que el esperma puede permanecer en los receptáculos antes de la fertilización o de la migración hasta el infundíbulo (Fox, 1956; Adams & Cooper JR, 1988), se cree que el esperma contenido en dichas estructuras podría contribuir a la fertilización de los ovocitos en ausencia de machos, o permitiría la paternidad múltiple (Uribe et al., 1998). En cuanto a el mecanismo de liberación del esperma contenido en los receptáculos

del infundíbulo existen dos hipótesis, la primera tiene que ver con la presencia de células mioepiteliales contráctiles que rodean los receptáculos, y entran en acción gracias a el control hormonal (Rojas, et al., 2015). La segunda apunta a que la liberación del esperma es mecánica; según Server & Ryan (1999) la presión ejercida por parte de los huevos recién ovulados a las paredes del ducto, produciría la liberación de los espermatozoides. Esta segunda hipótesis parece aplicar para *Atractus* sp, ya que no se observaron células mioepiteliales en los receptáculos.

### **5.3 TAMAÑO DE LA POSTURA**

El tamaño de postura encontrado para *Atractus* sp, oscila entre dos y máximo cuatro huevos. Esto difiere con lo encontrado para otras especies del género, como *A. major*, *A. schach*, *A. snethlageae* y *A. torquatus*, para las cuales se han reportado posturas grandes de hasta 9 huevos (Martins & Oliveira, 1998), pero coincide con lo hallado para *A. emigdioi*, (Esqueda & La Marca, 2005). No obstante, el tamaño de la postura de *Atractus* sp, podría variar con respecto a su LRC, pues como se ha descrito en otras especies de serpientes, existe una correlación positiva entre, la longitud rostro cloaca y el número de huevos, y una correlación negativa entre el número de huevos y el tamaño de los neonatos (Goldberg, 2001; Ford & Seigel, 1989). Teniendo en cuenta que en nuestro muestreo no fueron halladas hembras ovígeras, es necesaria una investigación más amplia para saber si la anterior afirmación es aplicable a la población de *Atractus* sp en cuestión.

### **5.4 ACTIVIDAD REPRODUCTIVA**

La reproducción de *Atractus* sp parecería ser continua a nivel poblacional. La presencia constante de hembras con folículos vitelogénicos durante el tiempo de muestreo, la observación de posturas en campo, la captura de individuos neonatos

y la no variación de las medidas morfométricas entre meses o estaciones, son indicios que apoyan nuestra sugerencia. Este hecho coincide con lo descrito por Martins & Oliveira (1998) para dos especies del género (*A. latifrons* y *A. torquatus*), ambas especies habitan zonas al norte de Brasil, donde el clima es tropical y no muestra variaciones importantes a lo largo del año (Resende & Nascimento, 2014). Sin embargo para *A. major*, especie también habita en zonas tropicales, la reproducción parece ser estacional (Martins & Oliveira, 1998), al igual que lo reportado para *A. pantostictus* y *A. reticulatus*, especies encontradas al sur de Brasil (Balestrin & Marcos, 2005; Resende & Nascimento, 2014).

La presencia de hembras adultas en diferentes estadios reproductivos (pre-vitelogénicas adultas, vitelogénicas I y II), durante los meses de muestreo, nos indica que, no todas las hembras adultas que componen la población se reproducen al mismo tiempo. Esto quiere decir que el ciclo aparentemente continuo de *Atractus* sp, podría ser resultado de reproducción asincrónica (Seigel & Ford, 1987). La anterior característica, ha sido reportada para otras poblaciones de serpientes con ciclos reproductivos continuos como *Oxyrhopus guibeii* (Pizzatto & Otavio, 2002).

Las serpientes en estado grávido ven reducida su capacidad de locomoción, por lo tanto el riesgo de ser pedradas aumenta y conseguir alimento es más difícil (Lourdais, et al., 2002; Shine, 2003; Brown & Shine, 2006), además la temperatura para estas hembras, es un factor crítico (Brown & Shine, 2006) y cambios bruscos podrían afectar la viabilidad de la nidada, por tales razones es posible que las hembras grávidas de *Atractus* sp, busquen refugio entre rocas y tierra más profunda, donde los cambios de temperatura son menores que en la superficie, y la exposición a depredadores también se reduce, lo cual hace más difícil capturarlas.

Muchas serpientes tropicales son conocidas por tener hábitos reproductivos no estacionales, la mayoría de especies que poseen esta característica, viven en lugares con condiciones climáticas casi constantes (Censky & McCoy, 1988). Se sabe que la actividad reproductiva en serpientes, está directamente influenciada por factores bióticos y abióticos como las tasas de predación, la disponibilidad de alimento, la precipitación y la temperatura respectivamente (Shine, 1991; Shine, 1997; Shine, 2003; Brown & Shine, 2006), siendo según Brown & Shine (2004), el factor hídrico y no la temperatura, la variable abiótica más importante para las especies que residen en los trópicos. Teniendo en cuenta que las condiciones de precipitación y temperatura de la zona donde se realizó esta investigación no muestran variaciones drásticas, se podría pensar que la población de *Atractus* sp estudiada, cuenta con condiciones casi constantes (por lo menos abióticas), que brindan un ambiente propicio en el cual las hembras pueden asegurar la reproducción. Sin embargo es necesario llevar a cabo un estudio más extenso, que abarque todo un año, para confirmar o rechazar las anteriores sugerencias.

## 6. CONCLUSIONES

- En general las características macro y microscópicas del ovario y el tracto reproductivo de *Atractus* sp siguen el patrón general reportado para la mayoría de los escamados.
- Las variaciones morfológicas del ovario y el oviducto entre estadios reproductivos se relacionan con el avance de la foliculogénesis, la presencia y almacenamiento de esperma, y las características del epitelio luminal y actividad de las glándulas uterinas,.
- El almacenamiento de esperma se produce en la parte posterior del infundíbulo.
- La madurez sexual en las hembras se alcanza a los 216mm (LRC) y el tamaño de postura es de máximo 4 huevos.
- Para los seis meses muestreados se encontró que la población posee una actividad reproductiva continua con asincronía intrasexual.

## BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, Caroline S; COOPER JR, William E. Oviductal morphology and sperm storage in the keeled earless lizard, *Holbrookia propinqua*. En: Herpetologica, 1988, Vol. 44, No. 2, p. 190-197.

ALDRIDGE, Robert D. The ovarian cycle of the watersnake *Nerodia sipedon*, and effects of hypophysectomy and gonadotropin administration. Herpetologica, 1982, Vol. 38, No. 1, p. 71-79.

ALDRIDGE, Robert D. Oviductal anatomy and seasonal sperm storage in the Southeastern Crowned Snake (*Tantilla coronata*). En: Copeia, 1992, Vol. 1992, No. 4, p. 1103-1106.

ALVES, Fátima Q; ARGÔLO, Antônio JS; CARVALHO, Gilson C. Reproductive biology of the bushmaster *Lachesis muta* (Serpentes: Viperidae) in the Brazilian Atlantic Forest. Phyllomedusa. En: Journal of Herpetology, 2014, Vol. 13, No. 2, p. 99-109.

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

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

BARROS, Verônica Alberto; ROJAS, Claudio Augusto; ALMEIDA-SANTOS, Selma Maria. Reproductive Biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. En: Advances in Zoology, 2014, Vol. 2014.

BETZ, T. W. The ovarian histology of the diamond-backed water snake, *Natrix rhombifera* during the reproductive cycle. En: Journal of morphology, 1963, Vol. 113, No. 2, p. 245-260.

BLACKBURN, Daniel G. Structure, function, and evolution of the oviducts of squamate reptiles, with special reference to viviparity and placentation. En: Journal of Experimental Zoology, 1998, Vol. 282, No 4-5, p. 560-617.

BROWN, G. P; SHINE, R. Maternal nest-site choice and offspring fitness in a tropical snake (*Tropidonophis mairii*, Colubridae). En: Ecology, 2004, Vol. 85, No. 6, p. 1627-1634.

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

CARNEIRO, Junqueira; JUNQUEIRA, L. Histologia básica: texto, atlas. Guanabara-Koogan, 2008.

CREE, Alison; GUILLETTE, Louis J; READER, Karen. Eggshell formation during prolonged gravidity of the tuatara *Sphenodon punctatus*. En: Journal of Morphology, 1996, Vol. 230, No. 2, p. 129-144.

CENSKY, Ellen J; MCCOY, C. Female reproductive cycles of five species of snakes (Reptilia: Colubridae) from the Yucatan Peninsula, Mexico. En: Biotropica, 1988, Vol. 20, No. 4, p. 326-333.

CREWS, David; GARSTKA, William R. The ecological physiology of a garter snake. En: Sci Am, 1982, Vol. 247, p. 158-168.

DOS SANTOS-COSTA, María Cristina; PRUDENTE, Ana; DI-BERNARDO, Marcos. Reproductive biology of *Tantilla melanocephala* (Linnaeus, 1758)(Serpentes, Colubridae) from Eastern Amazonia, Brazil. En: Journal of Herpetology, 2006, Vol. 40, No. 4, p. 553-556.

ESQUEDA, Luis Felipe. Revisión taxonómica y biogeográfica (con descripción de cinco nuevas especies) del género *Atractus* (Colubridae: Dipsadinae) en los Andes de Venezuela. En: Herpetotropicos, 2005, Vol. 2, No 1, p. 1-32.

FORD, Neil; SEIGEL, Richard A. Relationships among body size, clutch size, and egg size in three species of oviparous snakes. En: Herpetologica, 1989, Vol. 45, No. 1, p. 75-83.

FOX, Wade. Seminal receptacles of snakes. En: The Anatomical Record, 1956, Vol. 124, No. 3, p. 519-539.

FOWLER, Ian R; SALOMÃO, M; JORDÃO, R. description of the female reproductive cycle in four species from the neotropical colubrid snake *Philodryas* (Colubridae, Xenodontinae). En: Snake-Nittagun-, 1998, Vol. 28, p. 71-78.

GIRLING, Jane E. The reptilian oviduct: a review of structure and function and directions for future research. En: Journal of Experimental Zoology, 2002, Vol. 293, No. 2, p. 141-170.

GOLDBERG, Stephen R. Seasonal ovarian histology of the ovoviparous iguanid lizard *Sceloporus jarrovi* Cope. En: Journal of morphology, 1970, Vol. 132, No. 3, p. 265-275.

GOLDBERG, Stephen R. Reproduction in the Mexican vine snake *Oxybelis aeneus* (Serpentes: Colubridae). En: The Texas journal of science, 1998, Vol. 50, No. 1, p. 51-56.

GOLDBERG, Stephen R. Reproduction in the twin-spotted Rattlesnake, *Crotalus pricei* (Serpentes: Viperidae). En: Western North American Naturalist, 2000, Vol. 60, No. 1, p. 98-100.

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

GOMEZ, Duperly; RAMÍREZ-PINILLA, Martha Patricia. Ovarian histology of the placentotrophic *Mabuya mabouya* (Squamata, Scincidae). En: *Journal of Morphology*, 2004, Vol. 259, No. 1, p. 90-105.

GURAYA, Sardul S. Germinal Beds, Oogenesis and Folliculogenesis. En *Ovarian Follicles in Reptiles and Birds*. Springer Berlin Heidelberg, 1989, Vol. 24, p. 6-21.

GUILLETTE, Louis J; JONES, Richard E. Ovarian, oviductal, and placental morphology of the reproductively bimodal lizard, *Sceloporus aeneus*. En: *Journal of Morphology*, 1985, Vol. 184, No. 1, p. 85-98.

HALPERT, Andrew P; GARSTKA, William R; CREWS, David. Sperm transport and storage and its relation to the annual sexual cycle of the female red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*. En: *Journal of Morphology*, 1982, Vol. 174, No. 2, p. 149-159.

HEULIN, Benoit; STEWART, J. R; SURGET-GROBA, Y; BELLAUD, P.; JOUAN, F; LANCIEN, G; & DEUNFF, J. Development of the uterine shell glands during the

preovulatory and early gestation periods in oviparous and viviparous *Lacerta vivipara*. En: Journal of Morphology, 2005, Vol. 266, No. 1, p. 80-93.

HOFFMAN, Loren H. Placentation in the garter snake, *Thamnophis sirtalis*. En: Journal of Morphology, 1970, Vol. 131, No. 1, p. 57-87.

KLOSTERMAN, Lorrie L. The ultrastructure of germinal beds in the ovary of *Gerrhonotus coeruleus* (Reptilia: Anguidae). En: Journal of morphology, 1983, Vol. 178, No. 3, p. 247-265.

LANCE, Valentine; LOFTS, Brian. Studies on the annual reproductive cycle of the female cobra, *Naja naja*. IV. Ovarian histology. En: Journal of Morphology, 1978, Vol. 157, No. 2, p. 161-179.

LOURDAIS, Olivier; BONNET, Xavier; DOUGHTY, Paul. Costs of anorexia during pregnancy in a viviparous snake (*Vipera aspis*). En: Journal of Experimental Zoology, 2002, Vol. 292, No. 5, p. 487-493.

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

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

MARTINS, Marcio; OLIVEIRA, M. Natural history of snakes in forests of the Manaus region, Central Amazonia, Brazil. En: Herpetological Natural History, 1998, Vol. 6, No. 2, p. 78-150.

ALDRIDGE, Robert D; SEVER, David M. Reproductive biology and phylogeny of snakes. En: Reproductive cycles of tropical snakes. Queensland: CRC Press, 2011. p. 511-550.

MEAD, Rodney A; EROSCHENKO, Victor P; HIGHFILL, Dick R. Effects of progesterone and estrogen on the histology of the oviduct of the garter snake, *Thamnophis elegans*. En: General and comparative endocrinology, 1981, Vol. 45, No. 3, p. 345-354.

MENDONÇA, Mary T; CREWS, David. Effects of ovariectomy and estrogen replacement on attractivity and receptivity in the red-sided garter snake (*Thamnophis sirtalis parietalis*). En: Journal of Comparative Physiology A, 1996, Vol. 178, No. 3, p. 373-381.

PERKINS, M. Jane; PALMER, Brent D. Histology and functional morphology of the oviduct of an oviparous snake, *Diadophis punctatus*. En: Journal of Morphology, 1996, Vol. 227, No. 1, p. 67-79.

PINTO, Roberta R; FERNANDES, Ronaldo. Reproductive biology and diet of *Liophis poecilogyrus poecilogyrus* (Serpentes, Colubridae) from southeastern Brazil. Phyllomedusa: En: Journal of Herpetology, 2004, Vol. 3, No. 1, p. 9-14.

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

PIZZATTO, Lígia. Body size, reproductive biology and abundance of the rare pseudoboini snakes genera *Clelia* and *Boiruna* (Serpentes, Colubridae) in Brazil. En: Phyllomedusa: Journal of Herpetology, 2005, Vol. 4, No. 2, p. 111-122.

PIZZATTO, Lígia; CANTOR, M; LIMA DE OLIVEIRA, j; MARQUES, O; CAMPOVILLA, V; MARTINS, M. Reproductive ecology of dipsadine snakes, with emphasis on South American species. En: *Herpetologica*, 2008, Vol. 64, No. 2, p. 168-179.

RADDER, Rajkumar S; PIZZATTO, Ligia; SHINE, Richard. Morphological correlates of life-history variation: is lizard clutch size related to the number of germinal beds in the ovary?. En: *Biological Journal of the Linnean Society*, 2008, Vol. 94, No. 1, p. 81-88.

RAMÍREZ-PINILLA, Marta Patricia; DE PÉREZ, G. R; & ALVARADO-RAMÍREZ, C. Oogenesis and the Ovarian Cycle. En: *Reproductive Biology and Phylogeny of Lizards and Tuatara*. Queensland: Barrie G.M. Jamieson, 2014. p. 213-252.

RAMOS-PALLARES, Eliana; SERRANO-CARDOZO, Víctor Hugo; RAMÍREZ-PINILLA, Martha Patricia. Reproduction of *Ptychoglossus bicolor* (Squamata: Gymnophthalmidae) in an Andean coffee shade plantation in Colombia. En: *South American Journal of Herpetology*, 2010, Vol. 5, No. 2, p. 143-150.

RAMOS-PALLARES, Eliana; ANAYA-ROJAS, J, M; SERRANO-CARDOZO, Víctor Hugo; RAMÍREZ-PINILLA, Martha Patricia. Feeding and Reproductive Ecology of *Bachia bicolor* (Squamata: Gymnophthalmidae) in Urban Ecosystems from Colombia. En: *Journal of Herpetology*, 2015, Vol. 49, No. 1, p. 108-117.

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

ROJAS, Claudio Augusto; BARROS, Verônica Alberto; ALMEIDA-SANTOS, Selma Maria. Sperm storage and morphofunctional bases of the female reproductive tract

of the snake *Philodryas patagoniensis* from southeastern Brazil. En: Zoomorphology, 2015, Vol. 134, No. 4, p. 577-586.

SAINT GIRONS, H. Le cycle reproducteur de la vipere a cornes, *Cerastes cereastes* (L). dans la nature et en captivite. En: Bulletin de la Société Zoologique de France, 1962 a, Vol. 87, p. 41-51.

SAINT GIRONS, H. Présence de réceptacles séminaux chez les caméléons. En: Beaufortia, 1962 b, Vol. 9, No. 106, p. 165-172.

SANTOS, x; LLORENTE, G, A; FERICHE, M; PLEGUEZUELOS, J, M; CASALS, F; de SOSTOA, A. Food availability induces geographic variation in reproductive timing of an aquatic oviparous snake (*Natrix maura*). En: Amphibia-Reptilia, 2005, Vol. 26, No. 2, p. 183-191.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, Paola María; RAMÍREZ-PINILLA, Martha Patricia; MIRANDA-ESQUIVEL, Daniel Rafael. Comparative histology of the vaginal-cloacal region in Squamata and its phylogenetic implications. En: Acta Zoologica, 2007, Vol. 88, No. 4, p. 289-307.

SEVER, David; RYAN, Travis J. Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*): Part I. Evidence for oviducal sperm storage. En: Journal of Morphology, 1999, Vol. 241, No. 1, p. 1-18.

SEVER, David; RYAN, Travis, MORRIS, T; PATTON, D; SWAFFORD, S. Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). II. Annual oviducal cycle. En: Journal of Morphology, 2000, Vol. 245, No. 2, p. 146-160.

SERVER, David; HAMLETT, W. Flame Sperm Storage in Reptiles. En: Journal of Experimental Zoology, 2002, Vol. 292, No.2, p. 187-199.

SEIGEL, R, A; & FORD, N, B. Reproductive ecology in Snakes. En: Ecology and Evolutionary Biology. Nueva York: R Seigel, J Collins & S Novak, 1987. p 210–252.

SIEGEL, Dustin S; SEVER, David. Utero-muscular twisting and sperm storage in viperids. En: Herpetological Conservation and Biology, 2006, Vol. 1, No. 2, p. 87-92.

SIEGEL, Dustin S; SEVER, David. Seasonal variation in the oviduct of female *Agkistrodon piscivorus* (Reptilia: Squamata): an ultrastructural investigation. En: Journal of Morphology, 2008, Vol. 269, No 8, p. 980-997.

SIEGEL, Dustin S; SEVER, David; RHEUBERT, Justin; GRIBBINS, Kevin. Reproductive biology of *Agkistrodon piscivorus* Lacépede (Squamata, Serpentes, Viperidae, Crotalinae). Herpetological Monographs, 2009, vol. 23, no 1, p. 74-107.

SIEGEL, Dustin; MIRALLES, A; CHABARRIA, R. E; & ALDRIDGE, R. D. Female reproductive anatomy: cloaca, oviduct, and sperm storage. En: Reproductive biology and phylogeny of snakes. Queensland: Barrie G.M. Jamieson, 2011. p. 347-409.

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

SHINE, Richard. Strangers in a strange land: ecology of the Australian colubrid snakes. En: Copeia, 1991, p. 120-131.

SHINE, Richard. Reproduction in Australian elapid snakes II. Female reproductive cycles. En: Australian Journal of Zoology, 1977, Vol. 25, No. 4, p. 655-666.

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

SCHUETT, G, W. Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers. Biology of the Pitvipers, 1992, p. 169-184.

URIBE, María Del Carmen A; OMANA, María, Elodia; QUINTERO, José; GUILLETTE, Louis. Seasonal variation in ovarian histology of the viviparous lizard *Sceloporus torquatus torquatus*. En: Journal of Morphology, 1995, Vol. 226, No. 1, p. 103-119.

URIBE, María Del Carmen A; PORTALES, Gloria; GUILLETTE, Louis. Ovarian folliculogenesis in oviparous Mexican lizard *Ctenosaura pectinata*. En: Journal of Morphology, 1996, Vol. 230, p. 90-112.

URIBE, María Carmen A; GONZALEZ-PORTER, Gracia; PALMER, Brent; GUILLETTE, Louis. Cyclic histological changes of the oviductal-cloacal junction in the viviparous snake *Toluca lineata*. En: Journal of Morphology, 1998, Vol. 237, No. 2, p. 91-100.

WHITTIER, Joan M; CREWS, David. Ovarian development in red-sided garter snakes, *Thamnophis sirtalis parietalis*: relationship to mating. En: General and comparative endocrinology, 1986, Vol. 61, No. 1, p. 5-12.

YAMANOUYE, N; SILVEIRA, P; ABDALLA, F; ALMEIDA-SANTOS, S, M; BRENO, M; SALOMÃO, M. Reproductive cycle of the Neotropical *Crotalus durissus*

*terrificus*: II. Establishment and maintenance of the uterine muscular twisting, a strategy for long-term sperm storage. En: General and comparative endocrinology, 2004, Vol. 139, No. 2, p. 151-157.

## ANEXOS

**Anexo A.** Números de colección de los individuos estudiados en esta investigación:

UIS-R-3028, UIS-R-3023, UIS-R-3035, UIS-R-3032, UIS-R-3021, UIS-R-3026,  
UIS-R-3024, UIS-R-3033, UIS-R-3031, UIS-R-3054, UIS-R-3048, UIS-R-3039,  
UIS-R-3038, UIS-R-3041, UIS-R-3042, UIS-R-3043, UIS-R-3061, UIS-R-3067,  
UIS-R-3063, UIS-R-3069, UIS-R-3068, UIS-R-3072, UIS-R-3071, UIS-R-3090,  
UIS-R-3091, UIS-R-3092, UIS-R-3095, UIS-R-3098, UIS-R-3111, UIS-R-3112,  
UIS-R-3113, UIS-R-3114, UIS-R-3122, UIS-R-3123, UIS-R-3263.