

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO DA NATUREZA

Paola Rosa de Oliveira

**História natural de *Ophiodes cf. fragilis* (Raddi, 1820) (Squamata, Anguinae):
aspectos morfológicos, reprodutivos, citogenéticos e locomotores**

Juiz de Fora

2021

Paola Rosa de Oliveira

**História natural de *Ophiodes cf. fragilis* (Raddi, 1820) (Squamata, Anguidae):
aspectos morfológicos, reprodutivos, citogenéticos e locomotores**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, área de concentração: Comportamento, Ecologia e Sistemática, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora.

Orientadora: Profa Dra. Bernadete Maria de Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos

Juiz de Fora

2021

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira, Paola Rosa de.
História natural de *Ophiodes cf. fragilis* (Raddi, 1820) (Squamata, Anguillidae): aspectos morfológicos, reprodutivos, citogenéticos e locomotores / Paola Rosa de Oliveira. -- 2021.
127 p. : il.

Orientadora: Bernadete Maria de Sousa
Coorientador: Jorge Abdala Dergam
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, 2021.

1. Cobras-de-vidro. 2. Caracterização cromossômica. 3. Modo locomotor. 4. Sistema urogenital. 5. Variação morfológica. I. Sousa, Bernadete Maria de, orient. II. Dergam, Jorge Abdala, coorient. III. Título.

**"História natural de *Ophiodes cf. fragilis* (Raddi, 1820) (Squamata, Anguillidae):
aspectos morfológicos, reprodutivos, citogenéticos e locomotores"**

Paola Rosa de Oliveira

Orientador: Profa. Dra. Bernadete Maria de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de doutora em Biodiversidade e Conservação da Natureza.

Aprovado em 24 de fevereiro de 2021.

Bernadete maria de souza

Profa. Dra. Bernadete Maria de Sousa
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF


Prof. Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos
Universidade Federal de Viçosa – UFV

Henrique Caldeira Costa
Prof. Dr. Henrique Caldeira Costa
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF


Prof. Dr. Vinicius Novaes Rocha
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF

Oscar Rocha-Barbosa
Prof. Dr. Oscar Rocha-Barbosa
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Maria Rita Silvério Pires
Profa. Dra. Maria Rita Silvério Pires
Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Dedico este trabalho a todos e todas que
entregam sua vida e acreditam na
Ciência e na Educação no Brasil.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado,
mas faz parte do processo da busca.
E ensinar e aprender não pode dar-se fora
da procura, fora da boniteza e da alegria.”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em todas as escolhas da minha vida.

A Universidade Federal de Juiz de Fora, pela bolsa de pesquisa de Pós-Graduação e pelo apoio estrutural para o desenvolvimento desta pesquisa. Por ter me oferecido, desde a graduação, um ensino público, gratuito e de qualidade, sendo resistência!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza da Universidade Federal de Juiz de fora, pelo ensino e oportunidade de realização deste estudo.

Aos lagartos que me despertam tamanha curiosidade e que possibilitaram a realização deste trabalho, de outros que foram realizados e dos que ainda serão.

A minha orientadora Profa Dra. Bernadete Maria de Sousa, por acreditar no meu potencial, confiando em mim como pessoa e profissional; por ser mais que orientadora, ser mãe, amiga e companheira de profissão. Obrigada por todos os conselhos, experiências e risadas compartilhadas.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos, que aceitou o desafio de coorientar uma doutoranda em outra universidade, sem muita experiência na citogenética e com modelos de estudos peculiares. Obrigada por tudo que me ensinou e por sempre deixar o “Beagle” de portas abertas.

Ao Prof. Dr. Oscar Rocha-Barbosa, o qual admiro e que tive a honra por compartilhar toda sua sabedoria de ciência e pesquisa. Saiba que sempre serei grata e que sempre terá um pão de queijo o esperando...

A Profa Dra. Maria Christina M. N. Castañon, por ser mais que uma simples colaboradora. Agradeço pelos conhecimentos compartilhados, tanto pessoal quanto profissional. Através de você aprendi toda a mágica da histologia, muito obrigada!

A Profa Dra. Juliane Floriano Lopes Santos, pela disponibilidade e assistência durante as análises estatísticas.

A Profa Dra. Simone Jaqueline Cardoso, pelos scripts para o R e para a vida! Obrigada por cada minutinho gasto comigo para resolver erros em scripts de estatística e cada conselho pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Renato Feio, pela disponibilidade dos espécimes da Coleção de Répteis da Universidade Federal de Viçosa, possibilitando a realização de parte deste estudo.

Ao Prof. Dr. Henrique Caldeira Costa, pelas conversas e pela ajuda nos impasses taxonômicos; além dos artigos compartilhados e conselhos da academia e da vida. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Guilherme Siniciato Terra Garbino, pela disponibilidade e explicações das análises relacionadas ao Software Mesquite.

Ao Prof. Dr. Roberto Júnio Pedrosa Dias, pelo apoio como coordenador do Programa de Pós-Graduação em Comportamento e Biologia Animal e pela inspiração como professor e pesquisador.

A todos os professores e pesquisadores que me ensinaram os encantos de ser bióloga no Brasil. Agradeço a cada um pelos ensinamentos compartilhados.

Aos profissionais do Centro de Triagem de Animais Silvestres de Juiz de Fora (CETAS – JF), do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – JF) e do Instituto Estadual de Florestas (IEF – JF), aqui representados por Valério M. Duque, Glauber Barino e Sarah Stutz, pelo apoio fundamental para realização de parte deste trabalho.

À Natália Travenzoli, pela ajuda, apoio e incentivo na reta final. Obrigada por transmitir com tanta alegria seu amor pelos cromossomos, com toda certeza foi contagiante!

Aos desenhistas e ilustradores Livia Cler, Luiza Costa e Ramiro M. R. Liquer, pela confecção dos desenhos esquemáticos deste trabalho.

À Ludymila Cruz, pela confecção dos mapas de distribuição deste trabalho.

Aos técnicos administrativos do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, em especial a Marlú Carvalho Ferreira e Dayane de Almeida Oliveira Lopes, por sempre se mostrarem solícitas nos meus anos no PPG.

A técnica administrativa do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Gislaine Matos Bento, pela disposição e atenção.

A técnica administrativa do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Tatiana, por estar sempre disponível na resolução de assuntos administrativos do Laboratório de Répteis e dos infindáveis orçamentos.

A técnica do Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Lúcia Mara Januário dos Anjos, por compartilhar sua experiência e aprendizado.

Ao técnico do Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Carlos Magno, por todo ensinamento compartilhado, por sempre me socorrer seja quando o corte não saía como esperado ou com um café fresquinho para aquecer o coração!

Ao “pessoal” do Laboratório de Sistemática Molecular (Beagle) da Universidade Federal de Viçosa, em especial Késsia Souza e Simone Duarte, por sempre me receberem com tanto carinho e atenção, estando disponíveis e sempre prontos a resolver os inúmeros problemas durante o processamento das amostras.

À Iara Alves Novelli, pela amizade, pelos ensinamentos e apoio durante o mestrado, que permaneceram durante o doutorado, dentro e fora da academia.

À Priscila Hote (e seus mascotes Joaquim e Pucca), por abrir sua casa inúmeras vezes em Viçosa. Pelas conversas e incentivos durante os experimentos errados e por compartilhar da alegria dos resultados positivos.

Ao Victor Almeida (“Snarf”), Filipe Almeida (“Sid”) e Thaís Teixeira, por contribuírem diretamente na execução de grande parte desta tese. Iniciaram como simples estagiários e se tornaram grandes amigos e companheiros de profissão. Nenhum “muito obrigada” consegue expressar o tamanho da gratidão que tenho por cada um de vocês...

Aos amigos de longa data e companheiros de pesquisa Sarah Mendes, Robson Carvalho, Pilar Cozendey, Larissa Cardoso, Alessandra Rezende, André Yves e Lúcio Lima. Não tenho como agradecer ao apoio na bancada, no laboratório, nos campos e na vida! Que ainda compartilhemos muitos anos de discussões estatísticas (para felicidade do André), risadas e churrascos.

Aos demais amigos do Laboratório de Répteis da Universidade Federal de Juiz de Fora, por me ensinarem tanto! Um agradecimento especial para Nathália Ribeiro, não tem como contar quantas vezes me salvou em assuntos da Coleção...

As amigas de graduação e de vida Ludymila Cruz, Ana Luiza Franco, Flávia Rangel e Victória Campos, que desde 2010 compartilham inseguranças e gargalhadas. Feliz por esse encontro e por ter vocês!

Aos amigos de Pós-Graduação, tanto do mestrado quanto do doutorado, que compartilham as incertezas e conquistas da profissão.

Aos Membros da Banca Avaliadora, pelo tempo disponibilizado para avaliação desta Tese e pelas valiosas sugestões.

A minha mãe Dolores Rosa e minha irmã Bruna Rosa, por suportarem minhas ausências e estresses diários; por serem meu porto seguro, minhas maiores incentivadoras, meus pilares e exemplos. Obrigada por todo apoio. Amo vocês!

Ao meu pai Paulo Oliveira, sua ausência nunca será preenchida e nossos momentos nunca serão esquecidos...

À toda minha família, por compartilharem meus sucessos e me ampararem nos momentos difíceis.

Foram quatro anos de muito aprendizado. Cresci como profissional e principalmente como pessoa. Aprendi que nada se faz sozinha, que a união faz a força e a pesquisa acontecer! Que a valorização da Ciência e dos cientistas (em grande parte composto por nós bolsistas) precisa ser revista e ouvida pelos demais. Que precisamos seguir, mesmo quando parece impossível, nunca desaminar, nunca desistir... Os meus agradecimentos são para essa pequena parte das inúmeras pessoas que acreditam e contribuem para a Ciência no Brasil. Muito obrigada!!!

RESUMO

Os lagartos do gênero *Ophiodes*, conhecidos popularmente como cobras-de-vidro, se caracterizam pelo corpo em formato serpentiforme, ausência de membros anteriores e membros posteriores rudimentares. Foram registrados em diferentes regiões do Brasil e em outros países da América do Sul. Apesar de suas peculiaridades morfológicas e grande distribuição geográfica, são raros os estudos conduzidos com espécies desse gênero. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de contribuir para o conhecimento de aspectos morfológicos, reprodutivos, citogenéticos e locomotores de uma espécie do gênero utilizando variadas metodologias. Considerando os impasses taxonômicos no gênero, optamos por nomear a espécie estudada como *Ophiodes cf. fragilis*. Os resultados demonstraram ausência de dimorfismo sexual associada a forma e tamanho em *Ophiodes cf. fragilis*. Quando avaliados os mesmos parâmetros foi possível diferenciar esta espécie de espécimes de *Ophiodes fragilis*. O sistema urogenital possui morfologia semelhante a anteriormente descritas para Squamata. Foi constatada variação morfológica microscópica associada a períodos reprodutivos e não reprodutivos do ano. Destaca-se a presença do segmento sexual renal nos rins de machos e fêmeas adultas. O hemipênis e o hemiclitéris possuem estruturas microscópicas similares, se distinguindo quanto ao formato e morfologia externa. O número e morfologia dos cromossomos de *Ophiodes cf. fragilis* foi semelhante ao já conhecido para outras espécies de *Ophiodes*. Novas análises de citogenética tradicional e molecular foram realizadas pela primeira vez para uma espécie do gênero. Os espécimes de *Ophiodes cf. fragilis* se locomovem predominantemente pelos modos serpentina e retilíneo, sendo observado a movimentação em determinadas situações do membro posterior vestigial. Há fortes indícios que o membro posterior seja um membro extremamente reduzido, e não vestigial, pela presença de ossículos que o sustentam com atividade metabólica e ligados a uma fina cintura pélvica. Os osteodermos estão presentes em todo o corpo do animal, com a morfologia dos canículos equivalente a descrita para o gênero. O presente estudo apresenta dados inéditos e complementa outras informações previamente conhecidas para o gênero. As metodologias utilizadas e os resultados obtidos poderão ser facilmente replicados e utilizados como base para estudos futuros com outras espécies de *Ophiodes*.

ABSTRACT

Lizards from genus *Ophiodes*, popularly known as glass snakes, are characterized by their serpentiform body, lack of forelimbs and rudimentary hindlimbs. They have been recorded in different regions of Brazil and other countries in South America. Despite their morphological peculiarities and wide geographic distribution, studies involving this genus are scarce. This work was developed aiming to contribute to morphological, reproductive, cytogenetic and locomotor aspects knowledges of species from the genus using several methodologies. Considering some genus taxonomic issues, we chose to name the species studied as *Ophiodes cf. fragilis*. The results showed no sexual dimorphism associated with shape and size in *Ophiodes cf. fragilis*. When the same parameters were evaluated, it was possible to differentiate this species from *Ophiodes fragilis* specimens. The urogenital system has a morphology similar to that previously described for Squamata. Microscopic morphological variation associated with reproductive and non-reproductive periods of the year was found. We highlight the presence of renal sexual segment in males and females adults' kidneys. The hemipenis and hemiclitors have similar microscopic structures, distinguishing themselves in shape and external morphology. The chromosomes number and morphology of *Ophiodes cf. fragilis* was similar to previous described for other species of *Ophiodes*. New analysis of traditional and molecular cytogenetics were performed for the first time for a species belonging to the genus. *Ophiodes cf. fragilis* specimens move predominantly by serpentine and rectilinear modes, with movement being observed in certain situations of vestigial posterior limb. There is a strong evidence that the posterior limb is an extremely reduced limb, not a vestigial one, due to presence of ossicles supporting it with metabolic activity and linked to a thin pelvic girdle. Osteoderms are present throughout the animal's body, with canicles morphology equivalent to that described for the genus. The present study presents unpublished data and complements other information previously known for the genus. The methodologies used and the results obtained can be easily replicated and used as a basis for future studies with other species of *Ophiodes*.

RESUMO PARA DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

Apesar de serem conhecidas pelas pessoas como cobras-de-vidro, esses animais de corpo alongado e fino, sem patas anteriores e com patas posteriores bem pequenas são lagartos. As espécies que ocorrem no Brasil e em alguns outros países da América do Sul pertencem ao gênero *Ophiodes*. Poucos estudos foram feitos com estas espécies, o que resulta em lacunas no conhecimento sobre várias características desses lagartinhos tão diferentes. Este estudo teve como objetivo preencher algumas dessas lacunas. Foi visto que os machos e as fêmeas não possuem diferenças em relação a forma e tamanho do corpo, da cabeça e da pata posterior. Quando comparadas duas espécies de cobras-de-vidro foram encontradas diferenças principalmente no tamanho do corpo, da cabeça e da pata posterior. Os órgãos relacionados a reprodução (testículos, ovários, epidídimos, ovidutos e ductos deferentes) são parecidos com os de serpentes e anfisbenas (cobras de duas cabeças). No grupo dos lagartos, serpentes e anfisbenas uma região do rim é modificada durante o período de reprodução, produzindo uma secreção importante. Essa região já foi identificada em machos adultos de outras espécies e aqui encontramos em fêmeas adultas, além dos machos. O órgão de cópula masculino é o hemipênis. Nas fêmeas pode ser observada uma estrutura na mesma região, com função ainda desconhecida, o hemiclitéris. O hemipênis e o hemiclitéris aqui estudados são diferentes a olho nu, mas possuem características muito semelhantes ao serem observados em microscópio. Assim como outras espécies de cobras-de-vidro, a espécie estudada teve o mesmo número e formato de cromossomos. Novas técnicas de coloração e visualização dos cromossomos foram utilizadas pela primeira vez para estudar uma cobra-de-vidro. As cobras-de-vidro se movem quase sempre em formato de “S” (= serpentina) e em linha reta (= retilínea); algumas vezes elas também movimentam a pata posterior, apesar de ela ser bem reduzida, podendo ter um papel importante para a locomoção desses lagartos. Este estudo traz novas informações e completa outras que já eram conhecidas para as cobras-de-vidro. Foram utilizadas diferentes técnicas, algumas delas pela primeira vez, podendo ser usadas em estudos comparativos com outras cobras-de-vidro e outras espécies de lagartos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa de distribuição das espécies formalmente descritas (*Ophiodes striatus*, *Ophiodes fragilis*, *Ophiodes yacupoi*, *Ophiodes intermedius*, *Ophiodes vertebralis*, *Ophiodes luciae* e *Ophiodes enso*) e espécies candidatas (*Ophiodes* sp. 1, *Ophiodes* sp. 2 e *Ophiodes* sp. 3) do gênero *Ophiodes* baseado nos trabalhos de Borges-Martins (1998), Cacciali e Scott (2015), Entiauspe-Neto et al. (2017) e Costa e Bérnils (2018)..... 23
- Figura 2:** Fotografia de exemplares do gênero *Ophiodes*. (a) *O. fragilis*; (b) *O. striatus*; (c) *O. vertebralis*; (d) *O. intermedius*; (e) *O. luciae*; (f) *O. enso*; (g) *O. sp 1*; (h) *O. sp 2*; (i) *O. sp 3*. Fonte: Modificadas de Borges-Martins (1998); Cacciali e Scott (2015); Entiauspe-Neto et al. (2017).....24
- Figura 3:** Mapa de distribuição dos espécimes de *Ophiodes cf. fragilis* analisados neste trabalho coletados nos seguintes municípios do estado de Minas Gerais (Brasil): Juiz de Fora, Ritópolis, Lavras, Cataguases, Ingaí, Ijaci, São João del Rei, Tiradentes, Chácara, Coronel Xavier Chaves, Ervália, Cristina, Viçosa 25
- Figura 4:** Fotografia de exemplares de *Ophiodes cf. fragilis* utilizados neste estudo. (a,b) Exemplares *in vivo*, destaque para coloração das escamas dorsais e ventrais; (c) exemplar preservado na Coleção de Répteis da Universidade Federal de Juiz de Fora. Fonte: arquivo pessoal26
- Figura 5:** Fotografia esquemática do hemipênis de *Ophiodes* com nomenclatura das regiões (a) e (b) porção sulcada (lado direito) e asulcada (lado esquerdo) do hemipênis de *O. fragilis* (barra de escala = 3 mm). Fonte: (a) Borges-Martins (1998); (b) Nunes et al. (2014) Estrutura dos osteodermos de *Diploglossus* (A-L) e *Ophiodes* (M-O) descritos por Strahm e Schwartz (1977) 28
- Figura 6:** Espécime adulta e neonatos de *Ophiodes striatus*. (a) Embriões encontrados durante a necropsia do espécime adulto; (b) embrião com destaque para o tamanho. Fonte: (a) Oliveira et al. (2020); (b) Bernardo e Pires (2006). 29
- Figura 7:** Fotografia esquemática do hemipênis de *Ophiodes* com nomenclatura das regiões (a) e (b) porção sulcada (lado direito) e assulcada (lado esquerdo) do hemipênis de *O. fragilis* (barra de escala = 3 mm). Fonte: (a) Borges-Martins (1998); (b) Nunes et al. (2014).30
- Figura 8:** Cariótipo de *Ophiodes striatus* (a) e *O. intermedius* (b). Fonte: (a) Beçak et al. (1972); (b) Hernando e Alvarez (2005)..... 31

- Figura 9:** Relação das variáveis morfométricas aferidas em *Ophiodes cf. fragilis* e *Ophiodes fragilis* pertencentes à Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Juiz de Fora - Répteis (CHUFJF-Répteis) e à Coleção de Répteis do Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa (MZUFV). Comprimento rostro-cloacal (SVL), comprimento da cauda (TL), comprimento dos membros posteriores vestigiais (LVL - medido do lado esquerdo), distância entre narinas (DN), comissura rostro-labial (FC), altura da cabeça (HH) e largura da cabeça (HW)..... 35
- Figura 10:** Escamas das vistas dorsal da cabeça, lateral direita da cabeça e membro vestigial direito de *Ophiodes cf. fragilis* com a localização dos marcos anatômicos (*landmarks*) analisados neste estudo. 37
- Figura 11:** (a, b) Gráficos da Análise de Componente Principal (PCA) das medidas comprimento-rostro-cloacal (SVL), largura da cabeça (HW), altura da cabeça (HH), distância entre as narinas (DN) e comprimento do membro vestigial (LVL) de espécimes fêmeas (rosa/cinza) e machos (azul/preto) de *Ophiodes cf. fragilis* (n = 57). (c, d) Gráficos da contribuição das variáveis analisadas (em porcentagem, %) nos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2). 38
- Figura 12:** (a, b) Gráficos da Análise de Componente Principal (PCA) das medidas comprimento-rostro-cloacal (SVL), largura da cabeça (HW), altura da cabeça (HH), distância entre as narinas (DN) e comprimento do membro vestigial (LVL) de espécimes de *Ophiodes cf. fragilis* (sp. 1, rosa/cinza) e *Ophiodes fragilis* (sp. 2, azul/preto) (n = 77). (c, d) Gráficos da contribuição das variáveis analisadas (em porcentagem, %) nos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2). 39
- Figura 13:** Gráfico da Análise de Componente Principal (PCA) mostrando a distribuição de valores da amostra no componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2) – fêmeas em vermelho e machos em azul – de escamas dorsais da cabeça de *Ophiodes cf. fragilis* (n = 51). Vetores em PC1 e PC2 indicando a tendência de achatamento da escama interparietal e alargamento na base da escama frontal 40
- Figura 14:** Gráfico da Análise de Componente Principal (PCA) mostrando a distribuição de valores da amostra no componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2) – fêmeas em vermelho e machos em azul – de escamas laterais da cabeça de *Ophiodes cf. fragilis* (n = 47). Vetores em PC1 indicando a tendência ao achatamento na porção superior da escama rostral e inferior da escama nasal somado ao alargamento nas porções superiores da escama nasal e 1º supralabial; e em PC2 indicando a tendência de alargamento da porção superior da escama rostral 41

- Figura 15:** Gráfico da Análise de Componente Principal (PCA) mostrando a distribuição de valores da amostra no componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2) – fêmeas em vermelho e machos em azul do formato do membro vestigial de *Ophiodes cf. fragilis* (n = 38). Vetores em PC1 indicaram a tendência ao achatamento do ponto interno (próximo a cloaca) e alargamento do ponto externo, ambos superiores; e em PC2 indicando a tendência oposta 42
- Figura 16:** Gráfico da Análise de Função Discriminante (DFA) de escamas dorsais (a - n = 51) e laterais (b - n = 47) da cabeça e do formato do membro vestigial (c - n = 38) de *Ophiodes cf. fragilis*. Fêmeas em vermelho e machos em azul 43
- Figura 17:** Gráfico da Análise de Componente Principal (PCA) mostrando a distribuição de valores da amostra no componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2) – *Ophiodes cf. fragilis* (azul) e *Ophiodes fragilis* (verde) (n = 71) – na análise interespecífica da variação de escamas dorsais da cabeça. Vetores em PC1 indicaram a tendência de alargamento na base da escama frontal e achatamento da base da escama interparietal. Vetores em PC2 indicaram a tendência ao achatamento da base da escama frontal e alargamento da porção superior da escama interparietal 44
- Figura 18:** Gráfico da Análise de Componente Principal (PCA) mostrando a distribuição de valores da amostra no componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2) – *Ophiodes cf. fragilis* (azul) e *Ophiodes fragilis* (verde) (n = 66) – na análise interespecífica da variação de escamas laterais da cabeça. Vetores em PC1 indicaram a tendência ao achatamento da porção superior da escama rostral e alargamento da porção inferior desta mesma escama; em PC2 os vetores indicaram tendência contrária a observada em PC1 para a escama rostral e o alargamento das escamas nasal e 1° supralabial 45
- Figura 19:** Gráfico da Análise de Componente Principal (PCA) mostrando a distribuição de valores da amostra no componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2) – *Ophiodes cf. fragilis* (azul) e *Ophiodes fragilis* (verde) (n = 49) – na análise interespecífica da variação do formato do membro vestigial. Os vetores em PC1 indicaram a tendência ao achatamento do ponto interno (próximo a cloaca) e alargamento do ponto externo, ambos superiores, do membro vestigial; com vetores em PC2 indicando a tendência do alargamento dos pontos internos e externos superiores marcados 46
- Figura 20:** Gráfico da Análise de Função Discriminante (DFA) de escamas dorsais (a - n = 71) e laterais (b - n = 66) da cabeça e do formato do membro vestigial (c - n = 49) interespecífica entre *Ophiodes cf. fragilis* (azul) e *Ophiodes fragilis* (verde). 47

- Figura 21:** Meses em que foram coletados e número amostrado de espécimes de *Ophiodes* cf. *fragilis* analisados no presente estudo. 52
- Figura 22:** Desenho esquemático do sistema urogenital de *Ophiodes* cf. *fragilis*.....54
- Figura 23:** (a, b, c) Microfotografias dos folículos primordiais observados nos ovários de *Ophiodes* cf. *fragilis* coradas com hematoxilina e eosina. T – teca; G – camada granulosa; ZP – zona pelúcida; O – ooplasma; N – núcleo; (*) – detalhe dos cromossomos no interior do núcleo. Escala: (a) 200x; (b, c) 400x. 55
- Figura 24:** Microfotografias do folículo atrésico (a) e corpo lúteo (b) observados nos ovários de *Ophiodes* cf. *fragilis* coradas com hematoxilina e eosina. A – folículo atrésico; CL – corpo lúteo; F - folículo. Escala: (a) 200x; (b) 100x. 55
- Figura 25:** Microfotografias do oviduto *Ophiodes* cf. *fragilis* coradas com hematoxilina e eosina. (a) Região do infundíbulo, (b) região uterina e (c) região vaginal. L – lúmen; N – musculatura lisa; CT – tecido conjuntivo; seta – glândulas da casca do ovo. Escala: (a, b, c) 200x. 56
- Figura 26:** Microfotografias dos testículos (a,b) e epidídimos (c,d) de *Ophiodes* cf. *fragilis* coradas com hematoxilina e eosina. (a,c) Atividade não reprodutiva; (b,d) atividade reprodutiva. L – lúmen; Sep – epitélio seminífero; Sg – espermatogônia; Sc – espermatócito; St – espermátide; S – espermatozoide; Triângulo – coorte; Eep – epitélio epididimário; Bc – células basais; Pc – células principais. Escala: 400x..... 57
- Figura 27:** Microfotografias dos rins de espécimes machos (a,b) e fêmeas (c,d) de *Ophiodes* cf. *fragilis* coradas com hematoxilina e eosina. (a,c) Período inicial de hipertrofia e produção da secreção do segmento sexual renal; (c,d) período de pico de produção de secreção do segmento sexual renal. SSK – segmento sexual renal; G – glomérulo renal; C – túbulo coletor; D – túbulo contornado distal; P – túbulo contornado proximal; (*) – grânulos secretores do segmento sexual renal. Escala: (a,c,d) 400x; (b) 100x..... 59
- Figura 28:** Microfotografias dos rins de espécimes machos (a,c,e) e fêmeas (b,d,f) de *Ophiodes* cf. *fragilis* coradas com ácido periódico de Schiff – PAS (a,b), tricrômio de Masson (c,d) e azul de Alcian (e,f). SSK – segmento sexual renal; (*) – grânulos secretores do segmento sexual renal. Escala: (a,c,e) 200x; (b,d,f) 400x. 60
- Figura 29:** Hemiclitóris (a,b,c,d) e hemipênis (e,f,g,h) de *Ophiodes* cf. *fragilis*. (a,e) Fotografia do hemiclitóris e hemipênis. (b,f) Figura esquemática do hemiclitóris e hemipênis. (c,d,g,h) Microfotografias do hemiclitóris e hemipênis. HP: hemipênis; HC: hemiclitóris; (*): artefato tecidual de eversão do hemipênis; CT: tecido conjuntivo; RM: músculo retractor do hemipênis

- e do hemiclitéris; BC: células sanguíneas; Seta: ornamentação do hemipênis e hemiclitéris 67
- Figura 30:** Cariótipo dos espécimes de *Ophiodes cf. fragilis* analisados. (A) Giemsa; (B) Bandeamento-C; (C) Região organizadora de nucléolo ativa no cromossomo 1 do par 1; e (D) Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), sequência de nucleotídeo GAG₍₁₀₎. A barra corresponde em (A) a 10 µm e em (B, C e D) a 5 µm 74
- Figura 31:** Reconstrução do número cromossômico (2n) ancestral por Parcimônia de Anguidae, baseada na proposta filogenética de Pyron (2017). Legenda: Azul – grupo 1, 2n = 22; Verde – grupo 2, 2n = 36; Amarelo – grupo 3, 2n = 38; Vermelho – grupo 4, 2n = 48; Preto – grupo 5, 2n = 44. 74
- Figura 32:** Desenho esquemático da pista utilizada para a análise do modo de locomoção em *Ophiodes cf. fragilis*. (A) madeira com pregos, (B) placas de vidro, (C) lixa e (D) areia..... 84
- Figura 33:** Desenhos esquemáticos dos movimentos locomotores observados em *Ophiodes cf. fragilis*. (a, b) Movimento retilíneo; destaque em (b) para o movimento “U”. (c 1 e 2) Movimento serpentina; ênfase nas diferentes amplitudes do “S”. (d, e) Disposição em laço; ênfase na complexidade do laço em (e). 88
- Figura 34:** Desenho esquemático da locomoção entre os pregos de *Ophiodes cf. fragilis* (a- c)..... 89
- Figura 35:** Fotografias do membro posterior esquerdo (a); membros posteriores do adulto (destacados pelo círculo branco - a) e do juvenil (proeminentes aos ossículos e cintura pélvica em linha pontilhada branca - c, d, e); e escamas e osteoderms (f) dos espécimes diafanizados de *Ophiodes cf. fragilis* analisado. (L) membro posterior; (BO) ossículos distais; (HO) ossículo proximal (PG) cintura pélvica; (OC) canalículos osteoderms; (*) Escamas 91
- Figura 36:** (a, b, c, d, e, f) Fotomicrografias de membros posteriores de *Ophiodes cf. fragilis* corado com hematoxilina e eosina. (BO) ossículos distais; (HO) ossículo proximal; (C) cartilagem; (S) escamas; (O) osteoderms; (*) células sanguíneas indicando atividade metabólica. Ampliação: 4x - a, e; 10x - b, c, d, f. 92

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Estudos citogenéticos com espécies de Anguidae e Anniellidae disponíveis na literatura..... | 78 |
| Tabela 2: Espécimes de <i>Ophiodes</i> cf. <i>fragilis</i> analisados com suas respectivas biometrias, identificação sexual e localidades em que foram coletados..... | 82 |
| Tabela 3: Resumo dos resultados obtidos no presente estudo de locomoção e morfologia associada de <i>Ophiodes</i> cf. <i>fragilis</i> | 86 |

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- sp.** – espécie
cf. – confronto com
v. – versão
et al. – e colaboradores
M – macho
F – fêmea
CRC / SVL – comprimento rostro-cloacal
TL – comprimento da cauda
LVL – comprimento dos membros vestigiais
L – membros vestigiais
DN – distância entre as narinas
CF – comissura rostro-labial
HH – altura da cabeça
PC – largura da cabeça
MC – massa corporal
TS – túbulos seminíferos
Sep – epitélio seminífero
Sg – espermatogônia
Sc – espermatócito
Eep – epitélio epididimário
Bc – células basais
Pc – células principais
A – folículo atrésico
C – citoplasma
N – núcleo
T – teca
TE – teca externa
TI – teca interna
CT – tecido conjuntivo
M – musculatura lisa
L – lúmen
PG – cintura pélvica

OC – canalículos dos osteodermos
Bo – ossículos anteriores
Ho – ossículos posteriores
S – escamas
O – osteodermos
TCP / P – túbulo contornado proximal
TCD / D – túbulo contornado distal
TC / C – túbulo coletor
SSR / SSK – segmento sexual renal
G – glomérulo renal
HP – hemipênis
HC – hemiclitéris
RM – músculo retractor do hemipênis/hemiclitéris
BC – células sanguíneas
Mc – macrocromossomos
mc – microcromossomos
m – metacêntrico
sbm – submetacêntrico
a – acrocêntrico
sba – subacrocêntrico
n – número amostral
2n – número cromossômico diploide
n° – número
NF – número cromossômico fundamental
h – horas
cm – centímetros
mm – milímetros
ml – mililitros
mg – miligrama
g – grama
Kg – quilograma
µm – micrometros
µl – microlitros
% – porcentagem

pg/N – picogramas por núcleo

pH – potencial hidrogeniônico

°C – graus Celsius

°GL – graus Gay-Lussac

HE – hematoxilina-eosina

PAS – Ácido Periódico de Schiff

KOH – hidróxido de potássio

HCl – ácido clorídrico

NOR – região organizadora de nucléolo

FISH – hibridização fluorescente *in situ*

PBS – tampão fosfato

SSC – solução salina

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

DNA – ácido desoxirribonucleico

PCA – Análise de Componente Principal

PC – componente principal

DFA - Análise de Função Discriminante

M – máximo (amplitude)

m – mínimo (amplitude)

± – desvio padrão

p – probabilidade

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

UFV – Universidade Federal de Viçosa

CHUFJF-Répteis – Coleção Herpetológica do Laboratório de Répteis da Universidade Federal de Juiz de Fora

MZUFV – Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa

IUCN – *International Union for Conservation of Nature*

ICMBIO – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

CEUA – Comitê de Ética Animal

CETAS-JF – Centro de Triagem de Animais Silvestres de Juiz de Fora

CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária

CFBio – Conselho Federal de Biologia

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | 7 |
| ABSTRACT | 8 |
| RESUMO PARA DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA | 9 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 10 |
| LISTA DE TABELAS..... | 15 |
| LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS | 16 |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 22 |
| 1- O gênero <i>Ophiodes</i> Wagler, 1828 | 22 |
| 2- Revisão Bibliográfica | 27 |
| 2.1- <i>Morfologia</i> | 27 |
| 2.2- <i>Reprodução</i> | 29 |
| 2.3- <i>Citogenética</i> | 30 |
| 2.4- <i>Comportamento</i> | 31 |
| CAPÍTULO I | 33 |
| Avaliação do dimorfismo sexual e variação interespecífica na cobra-de-vidro <i>Ophiodes</i> cf. <i>fragilis</i> (Raddi, 1820) (Squamata: Anguinae)..... | 33 |
| 1- INTRODUÇÃO..... | 33 |
| 2- MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 2.1- <i>Espécimes estudados</i> | 35 |
| 2.2- <i>Morfometria linear</i> | 35 |
| 2.3- <i>Morfometria Geométrica</i> | 36 |
| 3- RESULTADOS | 37 |
| 3.1- <i>Morfometria linear</i> | 37 |
| 3.2- <i>Morfometria Geométrica</i> | 40 |
| 4- DISCUSSÃO | 47 |
| CAPÍTULO II..... | 50 |
| Caracterização morfológica do sistema urogenital e suas aplicações ecológicas em <i>Ophiodes</i> cf. <i>fragilis</i> (Raddi, 1820) (Squamata: Anguinae) do sudeste do Brasil | 50 |
| 1- INTRODUÇÃO..... | 50 |

| | |
|--|----|
| | 20 |
| 2- MATERIAL E MÉTODOS | 52 |
| 3- RESULTADOS | 53 |
| 4- DISCUSSÃO | 60 |
| CAPÍTULO III*..... | 65 |
| Primeiro relato de hemiclitoris em fêmeas de lagartos do gênero <i>Ophiodes</i> Wagler, 1828 (Squamata: Anguidae) | 65 |
| 1- INTRODUÇÃO..... | 65 |
| 2- MATERIAL E MÉTODOS | 66 |
| 3- RESULTADOS | 66 |
| 4- DISCUSSÃO | 67 |
| CAPÍTULO IV | 69 |
| Caracterização citogenética e padrão do DNA repetitivo em <i>Ophiodes</i> cf. <i>fragilis</i> (Raddi, 1820) (Squamata: Anguidae) do sudeste do Brasil | 69 |
| 1- INTRODUÇÃO..... | 69 |
| 2- MATERIAL E MÉTODOS | 70 |
| 2.1- Espécimes analisados | 70 |
| 2.2- Preparação da suspensão celular..... | 71 |
| 2.3- Análises citogenéticas tradicionais..... | 71 |
| 2.4- Análise citogenética molecular..... | 72 |
| 2.5- Reconstrução do número cromossômico ancestral..... | 72 |
| 3- RESULTADOS | 73 |
| 4- DISCUSSÃO | 75 |
| CAPÍTULO V..... | 80 |
| Locomoção e adaptações morfológicas na cobra-de-vidro <i>Ophiodes</i> cf. <i>fragilis</i> (Raddi, 1820) (Squamata: Anguidae)..... | 80 |
| 1- INTRODUÇÃO..... | 80 |
| 2- MATERIAL E MÉTODOS | 82 |
| 2.1- Espécimes Analisados..... | 82 |
| 2.2- Comportamento Locomotor | 83 |
| 2.3- Diafanização..... | 84 |
| 2.4- Histologia..... | 85 |

| | |
|--|-----|
| 3- RESULTADOS | 85 |
| 3.1- <i>Locomoção</i> | 85 |
| 3.2- <i>Morfologia associada à locomoção</i> | 90 |
| 4- DISCUSSÃO | 93 |
| CONCLUSÕES | 96 |
| REFERÊNCIAS | 98 |
| ANEXO I..... | 117 |
| ANEXO II..... | 118 |

INTRODUÇÃO GERAL

1- O gênero *Ophiodes* Wagler, 1828

A ordem Squamata é compreendida pelos lagartos (Lacertilia), pelas anfisbenas - cobras de duas cabeças (*Amphisbaenia*) e pelas serpentes (*Ophidia*) (UETZ et al, 2021). São reconhecidas quase 7 mil espécies mundialmente de lagartos (UETZ et al., 2021), sendo que destas cerca de 270 são encontradas no Brasil (COSTA e BÉRNILS, 2018).

Recentemente, Burbrink e colaboradores (2020) sugeriram uma nova filogenia para Squamata a partir de dados genômicos. Nesta proposta Diploglossinae (*Anguidae*) foi elevada a família (*Diploglossidae*). No entanto, ao longo deste trabalho utilizaremos a classificação adotada pela Lista de Répteis Brasileiros (COSTA e BÉRNILS, 2018) a qual considera *Diploglossinae* subfamília de *Anguidae*. *Diploglossinae* é composta pelos gêneros *Celestus*, *Diploglossus* e *Ophiodes* (PYRON et al., 2013; PYRON, 2017). No Brasil podem ser encontradas seis espécies desta subfamília: *Diploglossus fasciatus* (Gray, 1831), *D. lessonae* Peracca, 1890, *Ophiodes fragilis* (Raddi, 1820), *Ophiodes enso* Entiauspe-Neto et al., 2017, *Ophiodes striatus* (Spix, 1825) e *Ophiodes yacupoi* Gallardo, 1966 (COSTA e BÉRNILS, 2018).

Os lagartos pertencentes ao gênero *Ophiodes* Wagler, 1828, popularmente conhecidos como cobras-de-vidro ou quebra-quebra, são endêmicos da América do Sul (BORGES-MARTINS, 1998; MACEY et al., 1999; ENTIAUSPE-NETO et al., 2017) (Figura 1). No Brasil, há registros de ocorrência nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do país (BORGES-MARTINS, 1998; COSTA e BÉRNILS, 2018) (Figura 1). Apresentam como principais características a presença de osteodermos na pele, cabeça pequena e pontiaguda, escamas dorsais e ventrais com o mesmo formato e tamanho, pulmão esquerdo menor que o direito, ausência de vestígios externos de membros anteriores, com membros posteriores rudimentares em forma de estilete, com o formato da cauda e do corpo cilíndricos (BORGES-MARTINS, 1998). São vivíparos lecitotróficos, ou seja, não existe uma conexão placentária aparente entre mãe e embrião, ocorrendo a nutrição embrionária através do vitelo (LEITÃO, 1973; ROCHA-BARBOSA et al., 1991; BARROS e TEIXEIRA, 2007; MONTECHIARO et al., 2011; CACCIALI e SCOTT, 2012,2015).

Atualmente, o gênero *Ophiodes* é composto por sete espécies: *Ophiodes fragilis*; *Ophiodes striatus*; *Ophiodes yacupoi*; *Ophiodes vertebralis* Bocourt, 1881; *Ophiodes intermedius* Boulenger, 1894; *Ophiodes luciae* Cacciali e Scott, 2015 e *Ophiodes enso*

(ENTIAUSPE-NETO et al., 2017; UETZ et al., 2021) (Figura 2a-f). Dentre as espécies formalmente descritas, há indícios de que *Ophiodes yacupoi* seja sinônimo de *Ophiodes fragilis* (BORGES-MARTINS, 1998). Borges-Martins (1998) ainda destaca a existência de outras três espécies candidatas (*Ophiodes* sp. “1”; *Ophiodes* sp. “2” e *Ophiodes* sp. “3”) (Figura 2g-i), a partir de análises de caracteres associados à escamação cefálica e corporal, ao formato da cabeça e dos membros posteriores e o padrão de coloração. Entretanto, até a presente data, estas possíveis espécies novas não foram ainda oficialmente descritas. Além disso, Borges-Martins (1998) e Cacciali e Scott (2015) destacam que o gênero *Ophiodes* pode englobar mais espécies do que as anteriormente supostas. No entanto, estudos de revisão taxonômica e filogenética deste grupo são inexistentes, estando ausentes estudos de definição filogenética para o gênero, se limitando a poucas descrições de novas espécies recentes (CACCIALI e SCOTT, 2015; ENTIAUSPE-NETO et al., 2017).

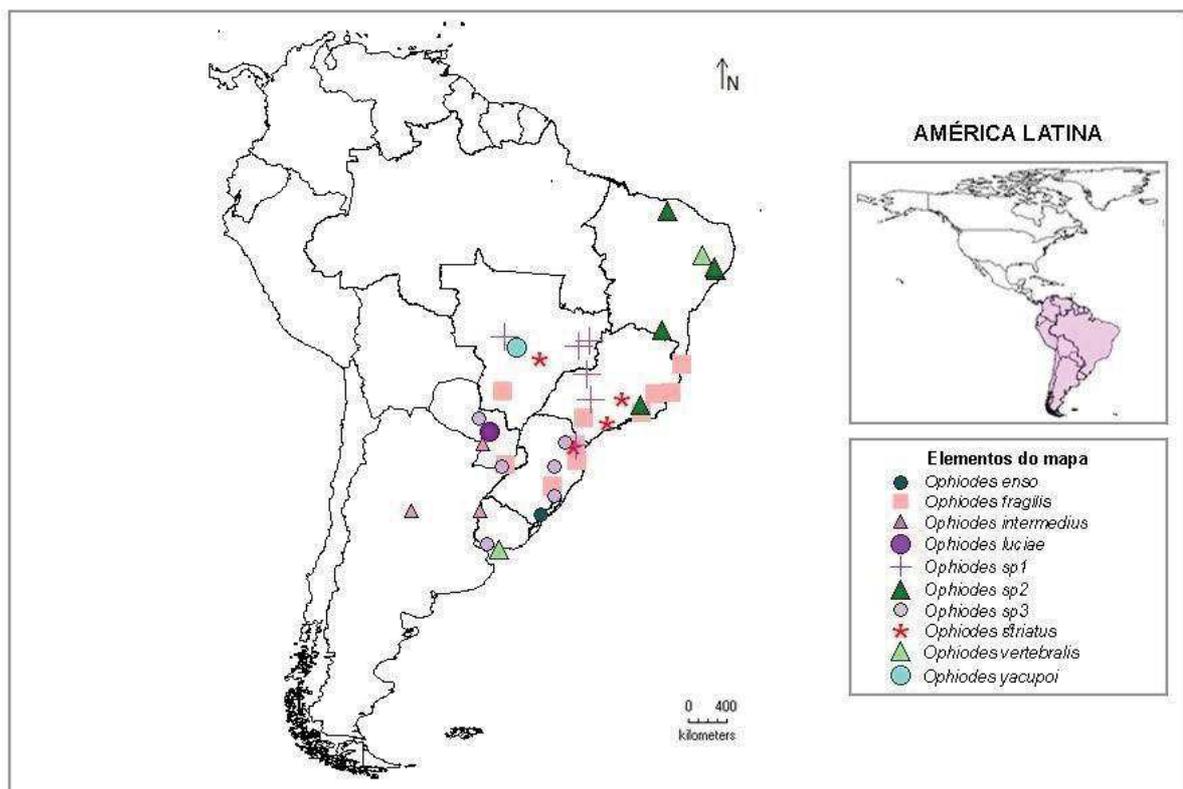


Figura 1: Mapa de distribuição das espécies formalmente descritas (*Ophiodes striatus*, *Ophiodes fragilis*, *Ophiodes yacupoi*, *Ophiodes intermedius*, *Ophiodes vertebralis*, *Ophiodes luciae* e *Ophiodes enso*) e espécies candidatas (*Ophiodes* sp. 1, *Ophiodes* sp. 2 e *Ophiodes* sp. 3) do gênero *Ophiodes* baseado nos trabalhos de Borges-Martins (1998), Cacciali e Scott (2015), Entiauspe-Neto et al. (2017) e Costa e Bérnils (2018).



Figura 2: Fotografia de exemplares do gênero *Ophiodes*. (a) *O. fragilis*; (b) *O. striatus*; (c) *O. vertebralis*; (d) *O. intermedius*; (e) *O. luciae*; (f) *O. enso*; (g) *O. sp 1*; (h) *O. sp 2*; (i) *O. sp 3*. Fonte: Modificadas de Borges-Martins (1998); Cacciali e Scott (2015); Entiauspe-Neto et al. (2017).

Devido às contradições taxonômicas anteriormente citadas, os espécimes analisados neste estudo foram classificados como *Ophiodes* cf. *fragilis* (Anexo I). As características principais observadas para identificação foram: (1) coloração dorsal amarronzada, com 3 listras pretas de diferentes espessuras, da porção posterior da cabeça até a cauda; (2) coloração ventral esverdeada (quando *in vivo*) ou dorso-lateralmente azul-esverdeado (quando preservado); (3) membros posteriores bastante reduzidos; e (4) pontos claros e escuros lateralmente na cabeça, iniciando após a escama nasal e terminando no início do tronco. Tais características foram associadas a *Ophiodes* sp “2” por Borges-Martins (1998), a qual é atribuída a distribuição ao sul, sudoeste e sudeste de Minas Gerais, além de regiões nos estados da Bahia, Alagoas, Pernambuco, Ceará e Rio de Janeiro (BORGES-MARTINS, 1998). Os espécimes identificados como *Ophiodes* cf. *fragilis* foram coletados nos seguintes municípios do estado de Minas Gerais (Brasil): Juiz de Fora, Ritópolis, Lavras, Cataguases, Ingaí, Ijaci, São João del Rei, Tiradentes, Chácara, Coronel Xavier Chaves, Ervália, Cristina e Viçosa (Figura 3). Contudo, como *Ophiodes* sp. 2 não foi formalmente descrita e, considerando a maior similaridade morfológica

dos espécimes analisados com *Ophiodes fragilis* do que com as demais espécies válidas, optamos por denominá-los como *Ophiodes cf. fragilis* (Figura 4a-c). Cabe ressaltar que os espécimes de *O. cf. fragilis* utilizados neste estudo foram identificados em estudos anteriores como *O. cf. striatus*, *O. striatus* e *O. fragilis* (como em Sousa et al., 2012; Cozendey et al., 2013; Trindade et al., 2013; Oliveira et al., 2020, 2021).

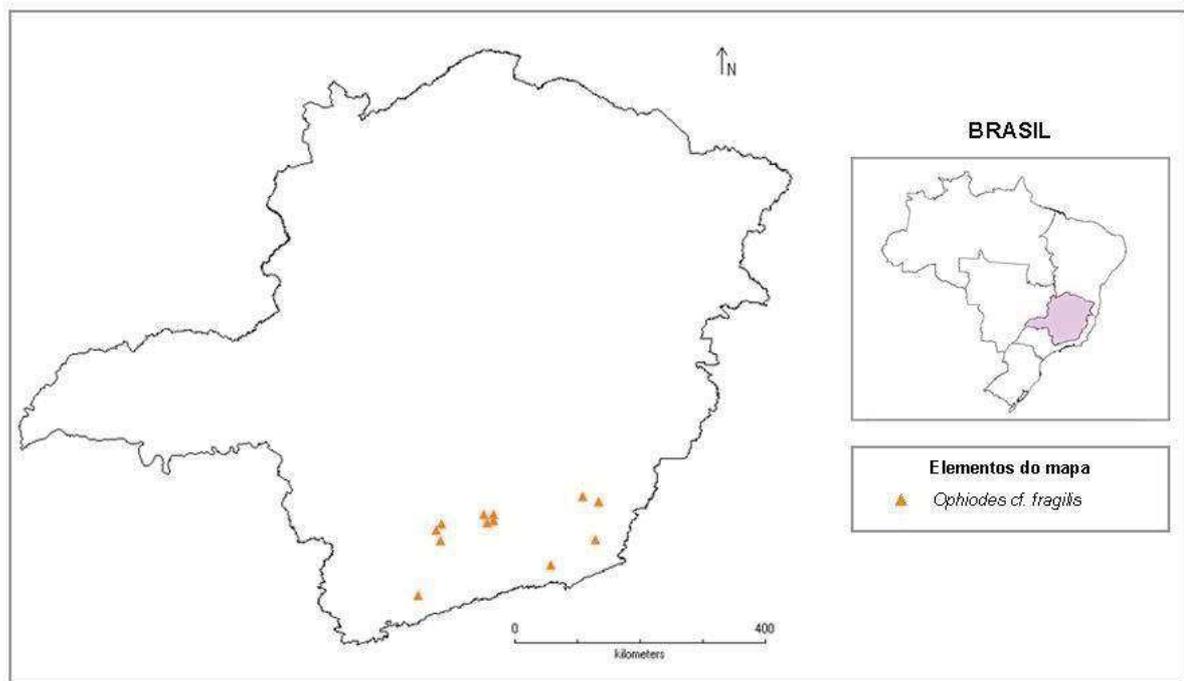


Figura 3: Mapa de distribuição dos espécimes de *Ophiodes cf. fragilis* analisados neste trabalho coletados nos seguintes municípios do estado de Minas Gerais (Brasil): Juiz de Fora, Ritópolis, Lavras, Cataguases, Ingaí, Ijaci, São João del Rei, Tiradentes, Chácara, Coronel Xavier Chaves, Ervália, Cristina, Viçosa.

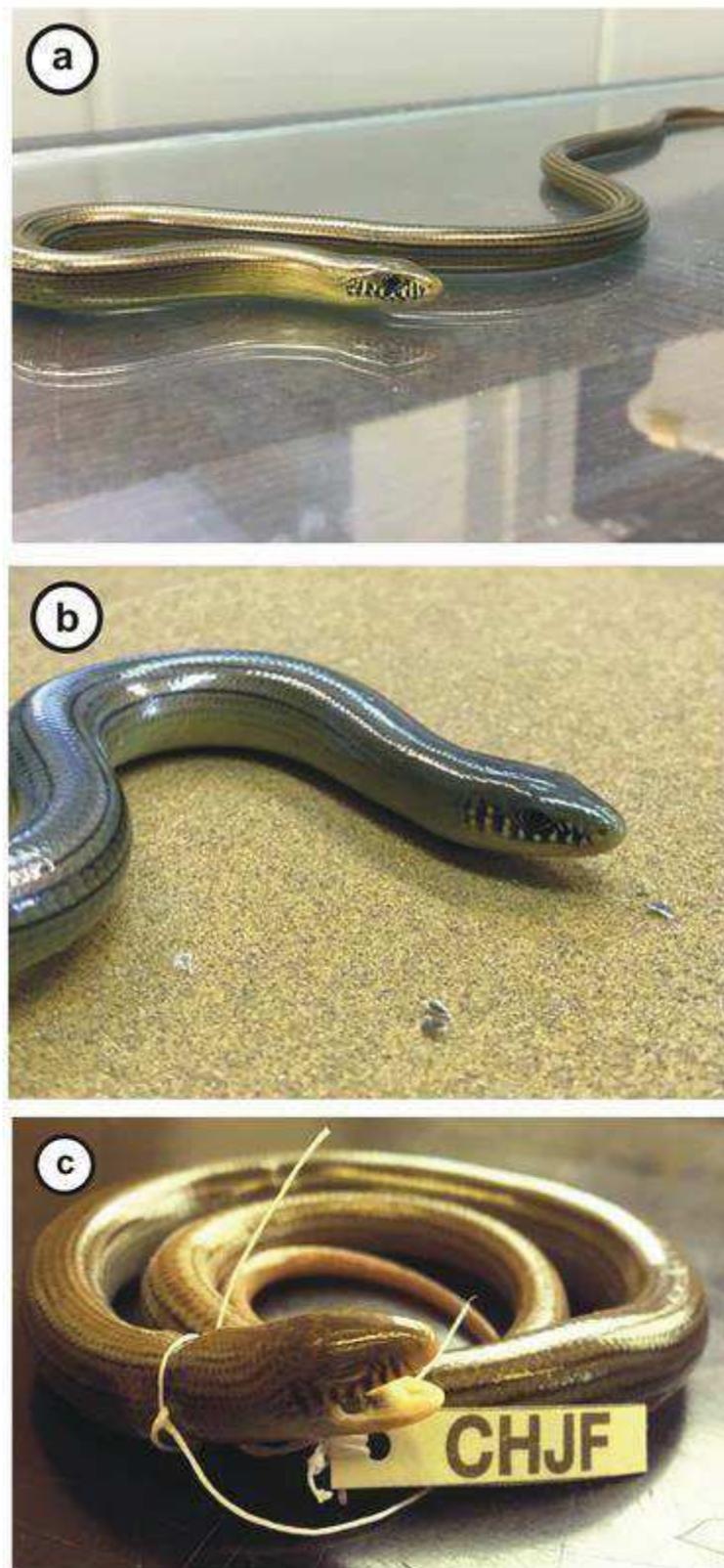


Figura 4: Fotografia de exemplares de *Ophiodes cf. fragilis* utilizados neste estudo. (a,b) Exemplares *in vivo*, destaque para coloração das escamas dorsais e ventrais; (c) exemplar preservado na Coleção de Répteis da Universidade Federal de Juiz de Fora. Fonte: arquivo pessoal.

2- Revisão Bibliográfica

Apesar de o gênero *Ophiodes* ter sido descrito em 1828, por Wagler, e a sua ampla distribuição geográfica (BORGES-MARTINS, 1998), pouco se conhece sobre características biológicas, ecológicas e comportamentais de espécies deste gênero. Esta falta de informações sobre o gênero pode ser atribuída, por exemplo, a dificuldade de obtenção de material para estudo, visto que devido ao seu hábito de vida criptozoico (MONTECHIARO et al., 2011; VITT e CALDWELL, 2014; OLIVEIRA et al., 2016; PIMENTA et al., 2019) dificultam sua coleta e captura. Entretanto, alguns trabalhos sobre morfologia, reprodução, genética e comportamento foram publicados com espécies do gênero.

Nos trabalhos listados nos itens 2.1, 2.2, 2.3 e 2.4 da revisão bibliográfica foram consideradas as identificações taxonômicas dos espécimes analisados de acordo com os autores de cada estudo.

2.1- Morfologia

Um dos mais relevantes estudos morfológicos com lagartos do gênero *Ophiodes* foi desenvolvido por Borges-Martins (1998). Esta revisão taxonômica e sistemática filogenética do gênero destaca-se por apresentar dados inéditos quanto a morfologia de caracteres reprodutivos, osteológicos, morfométricos e de escamação, além da descrição de uma chave de identificação taxonômica para *Ophiodes*. Tais resultados, apesar de ainda não publicados, servem de base para diversos estudos com espécies do gênero. Características osteológicas também foram o foco do estudo de Alves et al. (1980) no qual descreveram detalhadamente os ossos do crânio de *Ophiodes striatus*.

Como exemplificado anteriormente, todas as espécies de *Ophiodes* são similares quanto à morfologia externa. Esta similaridade pode ser observada tanto em nível taxonômico quanto sexual. Até o presente momento, ainda não foi descrita variação morfológica externa (como coloração e ornamentação) para diferenciação sexual dos espécimes do gênero.

O dimorfismo sexual em *Ophiodes* foi analisado principalmente quanto ao tamanho, evidenciando a tendência de fêmeas maiores que machos (PIZZATO, 2005; BARROS e TEIXEIRA, 2007; MONTECHIARO et al., 2011; ORTIZ et al., 2017). Em espécimes de *O. striatus*, as fêmeas apresentaram comprimento rostro-cloacal (CRC) médio variando de 161,04 a 170,7 mm; quanto aos machos, o CRC médio variou de 146,66 a 160,0 mm (BARROS e TEIXEIRA, 2007; MONTECHIARO et al. 2011). Para espécimes de *O. fragilis*, o CRC médio observado em fêmeas foi de 192,5 mm e em machos de 158,9 mm (PIZZATO, 2005). E para

O. intermedius foi relatado CRC médio de 160,5 mm para espécimes fêmeas e de 136,7 mm para espécimes machos (ORTIZ et al., 2017).

A diferenciação morfológica externa, além do estudo de Borges-martins (1998), foi analisada por Oliveira et al. (2016) indicando uma variação da forma e tamanho das escamas cefálicas em *O. fragilis* coletados em duas populações distintas da região Sul do Brasil. Outro caminho promissor para análise de variação morfológica em *Ophiodes* é a descrição estrutural dos osteodermos (placas ósseas que sustentam as escamas epidérmicas) (STRAHM e SCHWARTZ, 1977; ROCHA-BARBOSA et al., 2015); esta estrutura é amplamente utilizada na sistemática de Anguillidae (ZYLBERBERG e CASTANET, 1985; BUFFRÉNIL et al., 2010; BOCHATON et al., 2015). Strahm e Schwartz (1977) descreveram a estrutura dos osteodermos de *Ophiodes* (Figura 5) como um sistema de canal arbóreo (= sistema radix) extenso e em forma de nuvem dentro da porção livre, sendo derivado de *Diploglossus* e apresentando evolução convergente com os anguideos da América do Norte (*Anguis* e *Ophisaurus*). Entretanto, estudos atuais (como de BOCHATON et al., 2015), ressaltam a necessidade de trabalhos que descrevam discriminadamente os osteodermos entre as espécies de *Ophiodes* e investiguem a variação dos mesmos dentro do gênero.

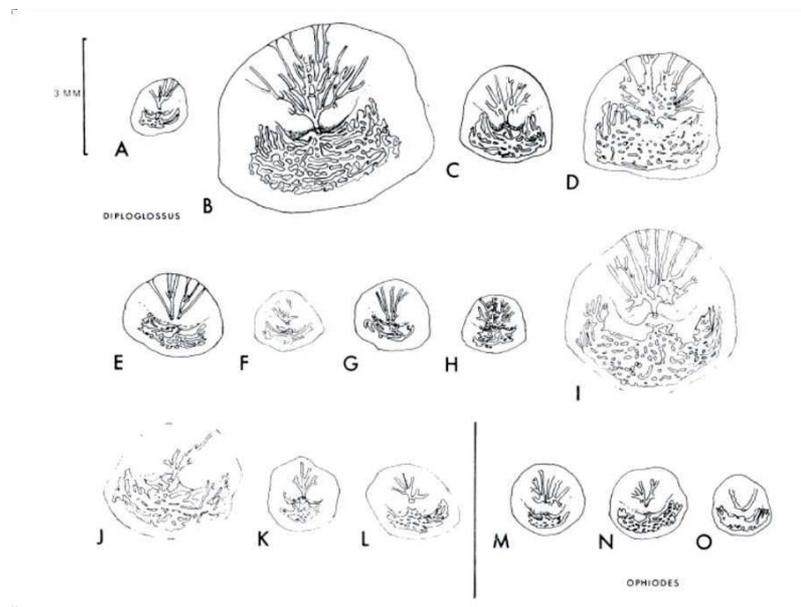


Figura 5: Estrutura dos osteodermos de *Diploglossus* (A-L) e *Ophiodes* (M-O) descritos por Strahm e Schwartz (1977).

2.2- Reprodução

Informações sobre características reprodutivas talvez sejam as mais exploradas dentro de *Ophiodes*. Há um compilado de informações quanto a modo reprodutivo, ciclo reprodutivo, tamanho da ninhada e dos neonatos (Figura 6). O modo reprodutivo de *Ophiodes* foi caracterizado como vivíparo lecitotrófico (= ovovivíparo) pela primeira vez por Gallardo (1966), discutido por Greer (1967) e confirmado posteriormente por Leitão (1973) através da necropsia de espécimes de *O. striatus*. Rocha-Barbosa et al. (1991) foram os pioneiros na descrição da parturição de uma fêmea de *O. striatus*, o que também reforçou o modo reprodutivo anteriormente descrito para a espécie/gênero.

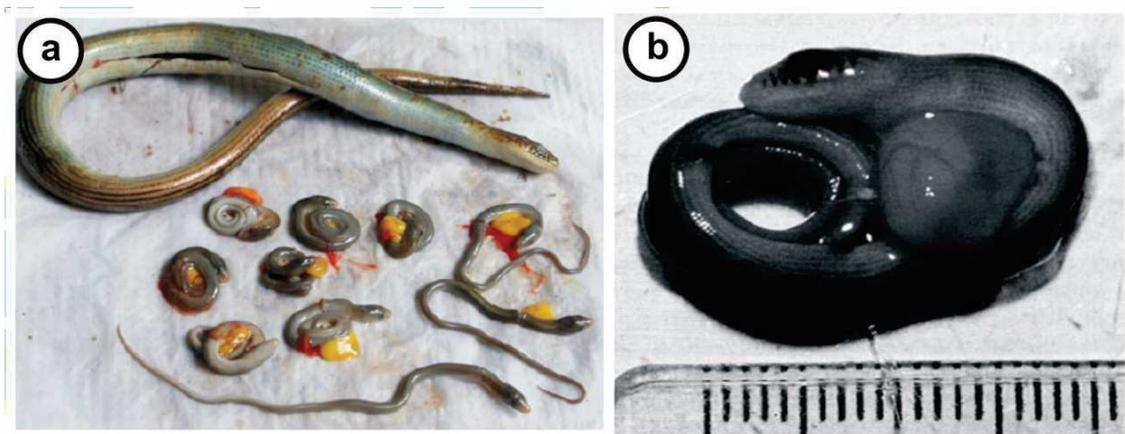


Figura 6: Espécime adulta e neonatos de *Ophiodes striatus*. (a) Embriões encontrados durante a necropsia do espécime adulto; (b) embrião com destaque para o tamanho. Fonte: (a) Oliveira et al. (2020); (b) Bernardo e Pires (2006).

O ciclo reprodutivo não foi elucidado com clareza em nenhuma das espécies do gênero *Ophiodes*. Com base nos estudos já realizados com espécies do gênero, sabemos que: *Ophiodes striatus* teria como época de acasalamento entre outubro e janeiro (LEITÃO, 1973), com vitelogênese secundária ocorrendo de fevereiro a outubro (MONTECHIARO et al., 2011) e tempo de gestação estimado em no mínimo 100 dias (ROCHA-BARBOSA et al., 1991). Para *O. fragilis* há informações quanto ao período de vitelogênese secundária ocorrendo em fevereiro, ovulação de março a junho e tempo de gestação de pelo menos cinco meses (PIZZATO, 2005). As fêmeas analisadas por Montechiaro et al. (2011) não apresentaram folículos e embriões simultaneamente no oviduto, confirmando que ocorre apenas uma gestação por temporada reprodutiva. O tamanho da ninhada é variável entre as espécies. Em *O. striatus* a literatura varia de 2 a 24 embriões/neonatos, com comprimento rostro-cloacal (CRC) variando

de 46 a 54 mm e massa corporal (MC) de 0,50 a 0,64 g (LEITÃO, 1973; ROCHA-BARBOSA et al., 1991; BERNARDO e PIRES, 2006; BARROS e TEIXEIRA, 2007; MONTECHIARO et al., 2011; TRINDADE et al., 2013). Em *O. fragilis* variou de 5 a 13 embriões, com CRC de 44,1 mm e MC de 0,69 g (PIZZATO, 2005). Greer (1967) descreveu para *O. vertebralis* uma variação de 9 a 15 “ovos”/filhotes. Cabe ressaltar que os dados acima apresentados podem sofrer modificações relacionadas as espécies estudadas, o que somente poderá ser esclarecido com uma grande revisão taxonômica do gênero.

Estudos que destacam a morfologia de estruturas reprodutivas em *Ophiodes* são raros. Destaca-se o estudo de Nunes et al. (2014) que analisaram a morfologia do hemipênis de *O. fragilis*, descrita anteriormente por Borges-Martins (1998) de maneira esquemática (Figura 7). O hemipênis de *O. fragilis* é uma estrutura dupla, bifurcada e descalcificada, com ornamentação plissada. As variações estruturais do hemipênis são de importância taxonômica (VALDECANTOS e LOBO, 2015), entretanto este órgão ainda não foi descrito em detalhes para as outras espécies do gênero.

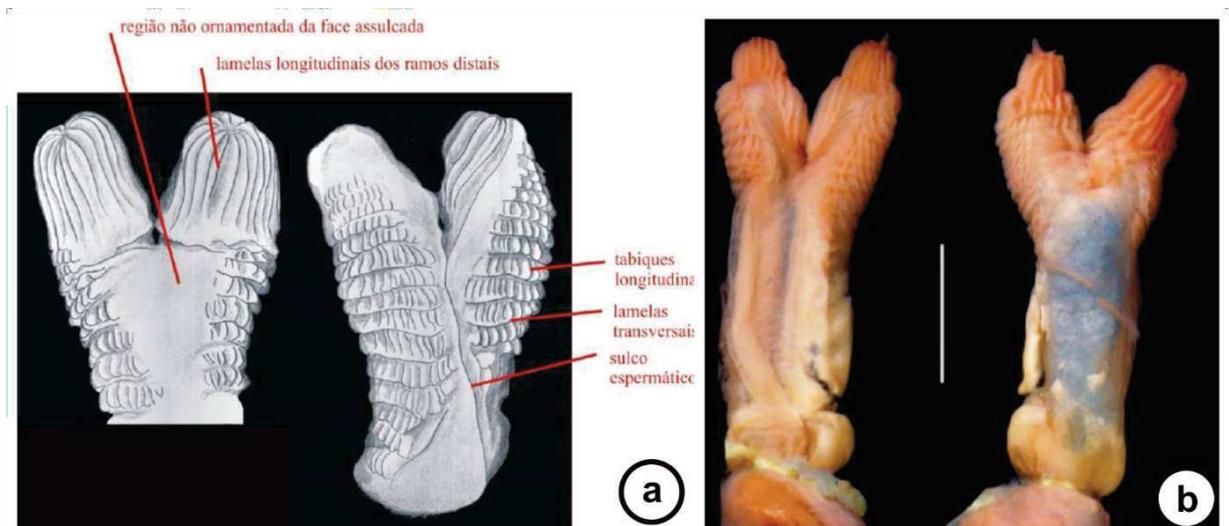


Figura 7: Fotografia esquemática do hemipênis de *Ophiodes* com nomenclatura das regiões (a) e (b) porção sulcada (lado direito) e assulcada (lado esquerdo) do hemipênis de *O. fragilis* (barra de escala = 3 mm). Fonte: (a) Borges-Martins (1998); (b) Nunes et al. (2014).

2.3- Citogenética

Na família Anguillidae, o número diploide ($2n$) pode variar de 30 a 48, com número fundamental entre 34 e 48 (HERNANDO e ALVAREZ, 2005). Os cariótipos de duas espécies do gênero *Ophiodes* (*O. striatus* e *O. intermedius*) foram anteriormente descritos. Ambos

apresentaram $2n = 36$ cromossomos, sendo 12 macrocromossomos e 24 microcromossomos (Figura 8), com a organização dos pares cromossômicos similares entres as duas espécies (BEÇAK et al. 1972; HERNANDO, 2002; HERNANDO e ALVAREZ, 2005). O tamanho do genoma foi relatado para *O. striatus*, por Olmo (1984), de 2,8 pg/N.

Beçak et al. (1972), ao estudarem os cromossomos de *O. striatus*, destacaram que os cariótipos foram os mesmos para ambos os sexos, com heteromorfismo do cromossomo sexual ausente. Entre os macrocromossomos, os pares 1, 3, 4 e 5 são metacêntricos e os pares 2 e 6 são submetacêntricos. A mesma organização de cromossômicos metacêntricos e submetacêntricos foi observada para *O. intermedius* (HERNANDO, 2002).

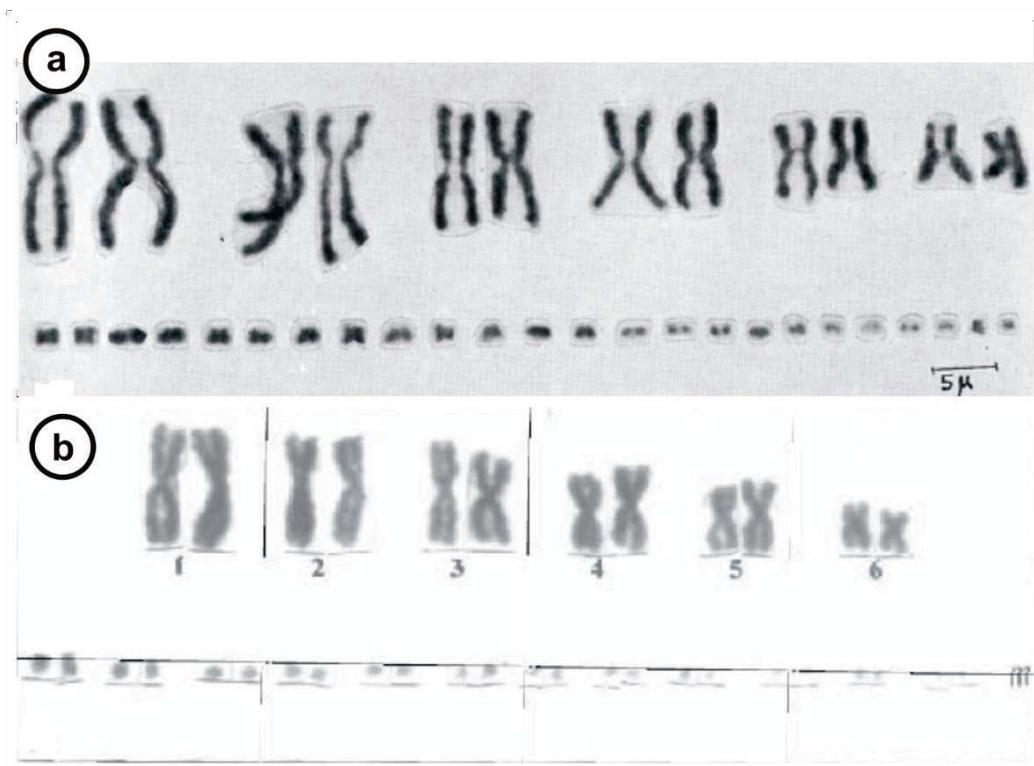


Figura 8: Cariótipo de *Ophiodes striatus* (a) e *O. intermedius* (b). Fonte: (a) Beçak et al. (1972); (b) Hernando e Alvarez (2005).

2.4- Comportamento

Pouco se conhece sobre o comportamento exibido por lagartos do gênero *Ophiodes*. Em relação aos seus hábitos de vida, sabe-se que tais espécies são criptozoicas, semifossoriais, podendo ser encontradas em serapilheiras e áreas de cobertura vegetal baixa (MONTECHIARO et al., 2011; VITT e CALDWELL, 2014; OLIVEIRA et al., 2016; PIMENTA et al., 2019).

Quanto ao hábito alimentar, as espécies de *Ophiodes* são classificadas como generalistas e oportunistas (BARROS e TEIXEIRA, 2007; MONTECHIARO et al., 2011; SILVA, 2019). Alimentam-se preferencialmente de insetos; no entanto, há registros de canibalismo (MONTECHIARO e ADAMS, 2009; MONTECHIARO et al. 2011).

Os comportamentos relacionados à reprodução e à defesa foram descritos por Rocha-Barbosa et al. (1991) e Pimenta et al. (2019), respectivamente. Rocha-Barbosa et al. (1991) relataram os comportamentos exibidos por uma fêmea de *O. striatus* durante a parturição de quatro filhotes. Enquanto Pimenta et al. (2019) caracterizaram o comportamento observado em um espécime de *O. striatus* (arquear a região anterior do corpo e rotacionar), durante um encontro ocasional, como defensivo.

Considerando o que foi apresentado anteriormente sobre *Ophiodes* e a exiguidade de estudos realizados com espécies deste gênero, buscamos analisar características morfológicas, reprodutivas, citogenéticas e comportamentais de *Ophiodes* utilizando como modelo *Ophiodes* cf. *fragilis*. Este trabalho foi realizado em cinco capítulos explorando diferentes questões. No Capítulo I procuramos responder as seguintes perguntas: (1) existe dimorfismo sexual nos espécimes analisados de *Ophiodes* cf. *fragilis*? e (2) existe variação morfológica entre os espécimes identificados como *Ophiodes* cf. *fragilis* com os espécimes de *Ophiodes fragilis*?. Nos Capítulos II e III descrevemos as características macro e microscópicas do sistema urogenital, do hemipênis e do hemiclitéris. No Capítulo IV apresentamos número, morfologia e marcações específicas nos cromossomos de *Ophiodes* cf. *fragilis* e apresentamos o provável número cromossômico ancestral da família Anguillidae. Por fim, no Capítulo V descrevemos o modo e a morfologia associada à locomoção de *Ophiodes* cf. *fragilis*. Após os capítulos que compõem este trabalho, são apresentadas as conclusões e caminhos futuros para estudos com *Ophiodes*.

CAPÍTULO I

Avaliação do dimorfismo sexual e variação interespecífica na cobra-de-vidro *Ophiodes cf. fragilis* (Raddi, 1820) (Squamata: Anguinae)

1- INTRODUÇÃO

A morfometria (= medida de forma) (MITTROECKER e GUNZ, 2009) é uma técnica amplamente utilizada para estudos de Répteis em geral. Grande parte dos estudos utiliza a técnica de morfometria linear para documentar variações na forma e tamanho (como RAMÍREZ-BAUTISTA et al., 2016). Por outro lado, a morfometria geométrica é uma alternativa que tem sido abordada a fim de minimizar ou substituir as técnicas invasivas utilizadas para medições de morfometria linear (MACEDO et al., 2017). Esta metodologia pode ser definida como a fusão entre a geometria e a biologia, compreendendo o estudo da forma em um espaço bi ou tri-dimensional, que permite a investigação, em profundidade, de mudanças morfológicas (MITTROECKER e GUNZ, 2009).

Ao longo dos anos, as análises morfométricas contribuíram para o maior entendimento de características populacionais/específicas (MONTECHIARO et al. 2011), de dimorfismo sexual (FABRE et al. 2014; KUKUSHKIN e DOVGAL, 2018), sobre evolução de características (GRIZANTE et al., 2010; BENÍTEZ e PÜSCHEL, 2014; GRAY et al., 2019), adaptações ecomorfológicas (KALIONTZOPOULOU et al., 2010) e taxonomia e diferenciação de espécies (RUANE, 2015; REJ e MEAD, 2017). Atualmente, há um crescente uso da morfometria geométrica no estudo de Répteis; este fato pode estar relacionado a esta técnica preservar a geometria das configurações de referência ao longo da análise e permitir o estudo da forma (MITTROECKER e GUNZ, 2009; BENÍTEZ e PÜSCHEL, 2014) de maneira integrada a diferentes fatores intra e interespecíficos.

Estudos sobre dimorfismo sexual em Répteis são frequentes, entretanto o mesmo ainda é pouco explorado (LJUBISAVLJEVIĆ et al., 2010). O dimorfismo sexual em lagartos pode ser evidenciado de diferentes formas como ornamentações, tamanho e colorações. Em algumas espécies de lagartos o dimorfismo sexual por tamanho corporal está diretamente relacionado à seleção sexual, no qual machos geralmente apresentam as medidas da cabeça maiores do que as das fêmeas e as fêmeas exibem o tamanho corporal maior do que os machos (OLSSON et al., 2002; PIANKA e VITT, 2003). Desta forma, a seleção sexual favoreceria a machos maiores na disputa pelas fêmeas e na defesa de território e às fêmeas com corpos maiores, que poderiam

gerar ninhadas numerosas (FABRE et al., 2014; KUKUSHKIN e DOVGAL, 2018). No entanto, o dimorfismo sexual por tamanho corporal não é regra. Para a família Anguillidae, de maneira geral, é relatado o dimorfismo sexual de tamanho e forma, tendo as fêmeas o corpo mais longo, cauda mais curta e cabeça mais compacta do que os machos (KUKUSHKIN e DOVGAL, 2018). Tais características foram anteriormente encontradas por diferentes autores para lagartos do gênero *Ophiodes* (PIZZATO, 2005; BARROS e TEIXEIRA, 2007; MONTECHIARO et al., 2011; ORTIZ et al., 2017).

Ophiodes (Wagler, 1828) é um gênero de lagartos que se caracterizam pela cabeça pequena e pontiaguda, cauda e corpo alongados, ausência de vestígios externos de membros anteriores, com membros posteriores rudimentares (PIZZATO, 2005; OLIVEIRA et al., 2016). São popularmente conhecidos como cobras-de-vidro, lagartos-de-vidro ou quebra-quebra. As espécies deste gênero podem ser encontradas na Argentina, Paraguai, Bolívia, Uruguai e Brasil (UETZ et al., 2021). No Brasil, está distribuído pelas regiões sudeste, centro-oeste, sul e nordeste do país (COSTA e BERNILS, 2018). Sete espécies compõem este gênero (*Ophiodes fragilis* (Raddi, 1820); *Ophiodes striatus* (Spix, 1825); *Ophiodes yacupoi* Gallardo, 1966; *Ophiodes vertebralis* Bocourt, 1881; *Ophiodes intermedius* Boulenger, 1894; *Ophiodes luciae* Cacciali e Scott, 2015 e *Ophiodes enso* Entiauspe-Neto et al., 2017) (ENTIAUSPE-NETO et al., 2017; UETZ et al., 2021), além de outras três espécies candidatas (*Ophiodes* sp. 1, *Ophiodes* sp. 2 e *Ophiodes* sp. 3) (BORGES-MARTINS, 1998). A semelhança morfológica entre as espécies de *Ophiodes*, associada a ampla distribuição geográfica atribuída a algumas espécies do gênero, reforça a hipótese de que o mesmo compreenderia mais espécies do que as antes descritas (BORGES-MARTINS, 1998; CACCIALI e SCOTT, 2015). Os espécimes aqui analisados possuem características atribuídas a espécie candidata *Ophiodes* sp. 2. Por ainda não ter sido oficialmente descrita e, dentre as espécies formalmente descritas, os espécimes deste estudo apresentarem características morfológicas mais próximas a *Ophiodes fragilis* optamos por nomeá-los como *Ophiodes* cf. *fragilis*.

Diante da raridade de estudos que avaliem a variação morfológica em diferentes espécies do gênero *Ophiodes*, e estudos de dimorfismo sexual utilizando a técnica de morfometria geométrica no gênero, o presente estudo teve como objetivo principal investigar o dimorfismo sexual em espécimes de *Ophiodes* cf. *fragilis* analisando variáveis aferidas no corpo, na cabeça e no membro vestigial e a variação de escamas da cabeça e do formato dos membros vestigiais. Utilizando os mesmos parâmetros para investigação do dimorfismo sexual, avaliamos a variação interespecífica entre *Ophiodes* cf. *fragilis* e *Ophiodes fragilis*.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Espécimes estudados

Foram estudados espécimes adultos de *Ophiodes cf. fragilis* (n = 57) e *Ophiodes fragilis* (n = 20) pertencentes à Coleções Científicas (Coleção Herpetológica do Laboratório de Répteis da Universidade Federal de Juiz de Fora e Coleção de Répteis do Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa) do estado de Minas Gerais, Brasil (Anexo II).

2.2- Morfometria linear

Foram aferidas as seguintes variáveis morfométricas em 77 espécimes de *Ophiodes*: comprimento rostro-cloacal (SVL), comprimento do membro posterior vestigial (LVL - medido do lado esquerdo), distância entre narinas (DN), altura da cabeça (HH) e largura da cabeça (HW), como mostrado na Figura 9. Devido ao modo de fixação de alguns espécimes, a medida linear foi obtida com o auxílio de uma linha, que percorreu todo o corpo do animal (do rostro a cloaca), posteriormente foi estendida em uma superfície lisa e teve seu valor aferido por meio de um paquímetro digital para determinar o tamanho de cada exemplar, com precisão de 0,01 mm. Os valores brutos obtidos estão especificados no Anexo II.

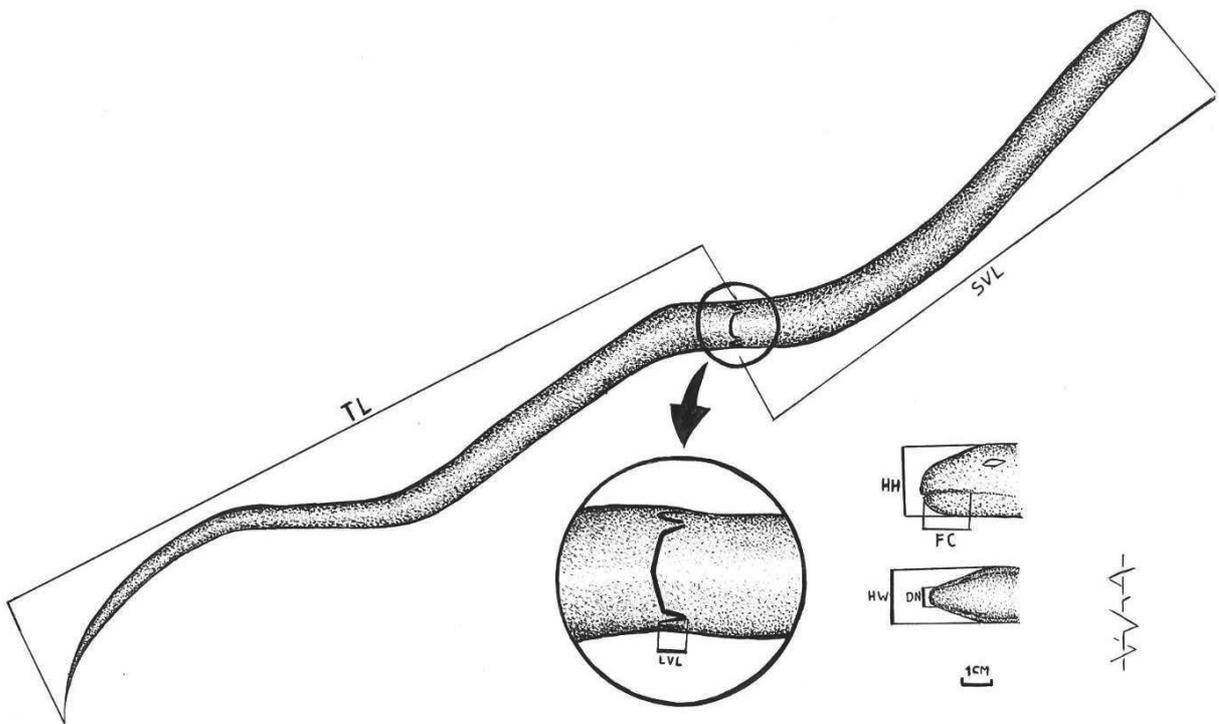


Figura 9: Relação das variáveis morfométricas aferidas em *Ophiodes cf. fragilis* e *Ophiodes*

fragilis pertencentes à Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Juiz de Fora - Répteis (CHUFJF-Répteis) e à Coleção de Répteis do Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa (MZUFV). Comprimento rostro-cloacal (SVL), comprimento da cauda (TL), comprimento dos membros posteriores vestigiais (LVL - medido do lado esquerdo), distância entre narinas (DN), comissura rostro-labial (FC), altura da cabeça (HH) e largura da cabeça (HW).

Através das medidas aferidas do corpo, cabeça e membro vestigial investigamos o dimorfismo sexual entre os espécimes de *Ophiodes cf. fragilis* e a variação interespecífica entre *Ophiodes cf. fragilis* e *Ophiodes fragilis*. Para avaliar o dimorfismo sexual e a variação interespecífica foram feitas pela Análise de Componente Principal (PCA) e a Análise de Variância Multivariada (MANOVA). Antes das análises de PCA e MANOVA os dados foram logaritimizados (log10), visando a redução do efeito do viés dos valores dentro da amostra. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa R versão 4.0.5 (R CORE TEAM, 2021).

2.3- Morfometria Geométrica

Foram realizadas fotografias em vista dorsal (n = 71) e lateral direita (n = 66) da cabeça e do membro vestigial direito (n = 49) dos espécimes de *Ophiodes* anteriormente especificados (Anexo II). Através dessas fotografias analisamos o dimorfismo sexual em *Ophiodes cf. fragilis* e a variação interespecífica comparando as escamas da cabeça (dorsal e lateral) e o formato do membro vestigial com *Ophiodes fragilis*. Os espécimes foram fotografados em mesa estativa, com câmera digital com macro Nikon®, modelo D3100 e lente 55 mm acoplada. A fim de padronização, uma régua de 30 cm foi utilizada para todas as imagens. A criação dos arquivos de imagem foi realizada no Software TpsUtil (ROHLF, 2006a) e os marcos anatômicos foram digitalizados no Programa TpsDig2 (ROHLF, 2006b). Nas imagens foram registradas 10 *landmarks* para a vista dorsal (correspondentes as escamas frontal e interparietal), 10 *landmarks* para a vista lateral da cabeça (correspondente as escamas rostral, nasal, 1º supralabial e pós-nasal – ponta do focinho) e 5 *landmarks* no membro vestigial (formato do membro, sem escamas específicas) (Figura 10). Os cálculos da forma morfométrica foram realizados no Programa MorphoJ através das Análises de Componente Principal (PCA) e Análise de Função Discriminante (DFA).

Marcos Anatômicos (*Landmarks*)

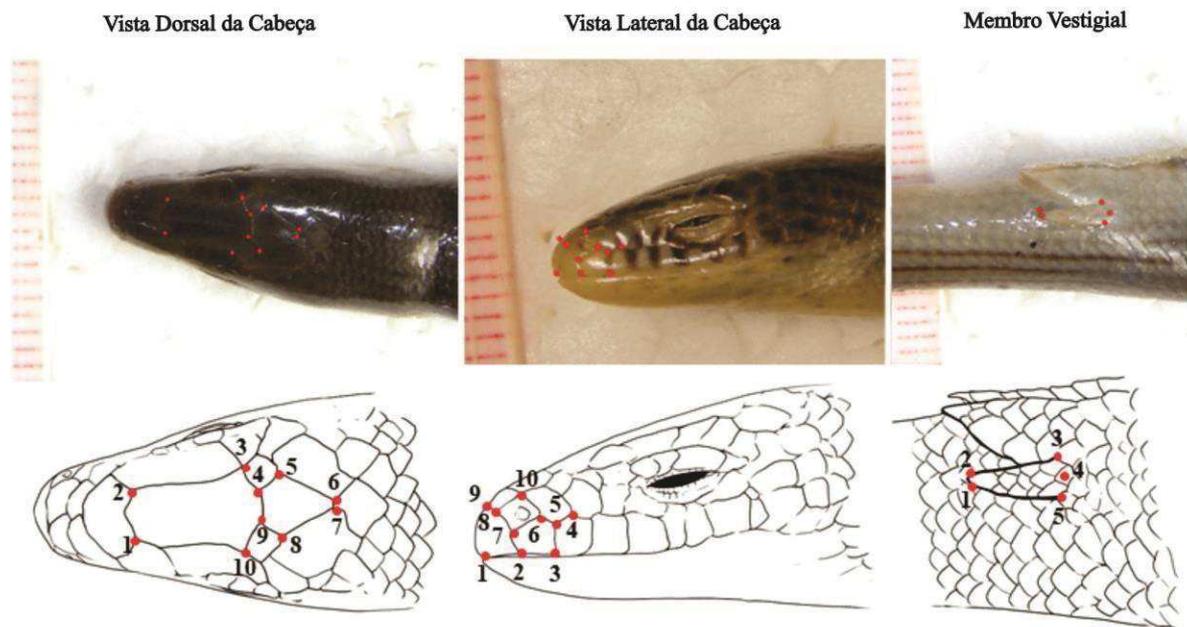


Figura 10: Escamas das vistas dorsal da cabeça, lateral direita da cabeça e membro vestigial direito de *Ophiodes* cf. *fragilis* com a localização dos marcos anatômicos (*landmarks*) analisados neste estudo.

3- RESULTADOS

3.1- Morfometria linear

A Análise de Componente Principal (PCA) não agrupou os espécimes de *Ophiodes* cf. *fragilis* ($n = 57$, 22 fêmeas e 35 machos) pelo sexo, indicando ausência de dimorfismo sexual (Figura 11a,b). As variáveis analisadas não apresentaram diferença significativa entre os sexos ($p = 0,9939$). O componente principal 1 (PC1) explicou 49% da variação da amostra. Enquanto o componente principal 2 (PC2) 25,4% da variação, com um percentual acumulativo (PC1 + PC2) igual a 74,4%. Os valores se distribuíram homogeneamente entre PC1 e PC2. As medidas da altura (HH) e largura (HW) da cabeça e distância entre as narinas (DN) apresentaram tendência a valores positivos de PC1 e de PC2. Enquanto os valores do comprimento rostro-cloacal (SVL) e do membro vestigial (LVL) tenderam a valores positivos de PC1 e negativos em PC2 (Figura 11a). A PCA sugere que a altura e largura da cabeça e a distância entre as narinas são correlacionadas positivamente entre si. Correlação semelhante também pode ser observada entre o comprimento rostro-cloacal e o membro vestigial, estando estas correlacionadas negativamente as variáveis da cabeça. Em PC1 a variável que mais contribuiu

para a variação dentro da amostra foi a largura da cabeça, seguida pela distância entre as narinas, altura da cabeça, comprimentos rostro-cloacal e do membro vestigial (Figura 11c). Entretanto, quando analisadas os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2), o comprimento rostro-cloacal foi a variável que mais contribuiu para a variação seguido pelo comprimento do membro vestigial, altura da cabeça, largura da cabeça e distância entre as narinas (Figura 11d).

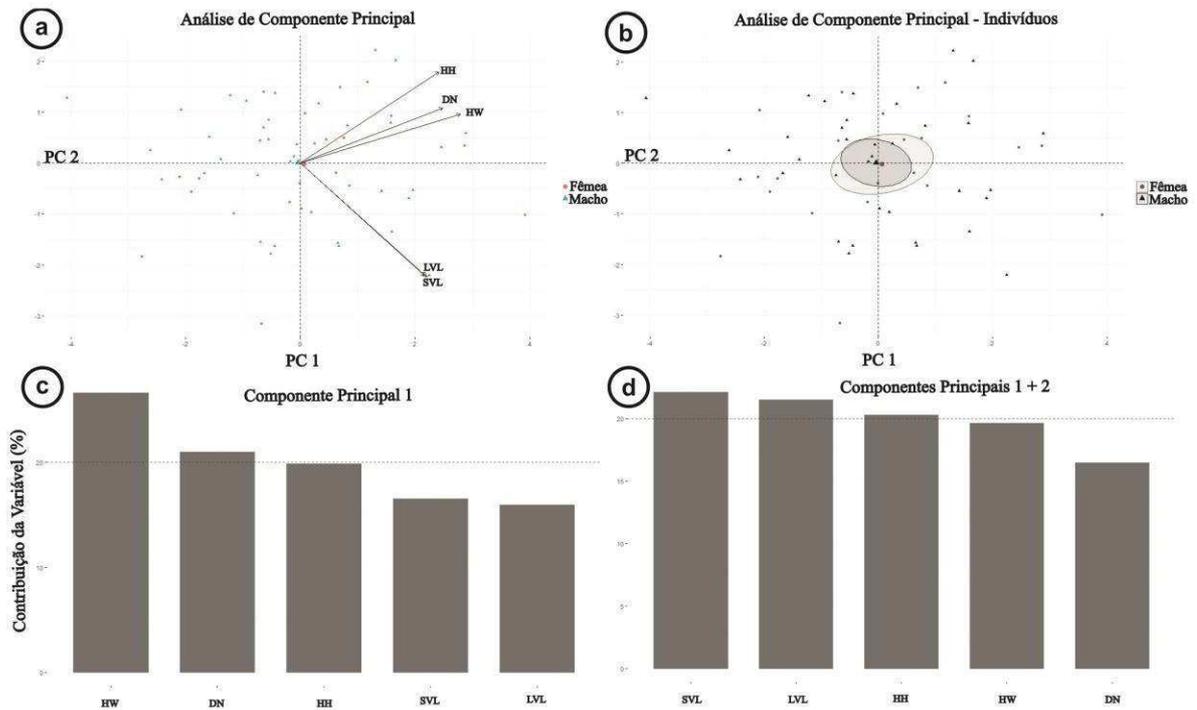


Figura 11: (a, b) Gráficos da Análise de Componente Principal (PCA) das medidas comprimento-rostro-cloacal (SVL), largura da cabeça (HW), altura da cabeça (HH), distância entre as narinas (DN) e comprimento do membro vestigial (LVL) de espécimes fêmeas (rosa/cinza) e machos (azul/preto) de *Ophiodes cf. fragilis* ($n = 57$). (c, d) Gráficos da contribuição das variáveis analisadas (em porcentagem, %) nos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2)

A variação entre os espécimes de *Ophiodes cf. fragilis* e *Ophiodes fragilis* ($n = 77$, 57 *O. cf. fragilis* e 20 *O. fragilis*) foi significativa ($p = 2.2e-16$). Apesar da amostra se distribuir homoganeamente entre os valores de PC1 e PC2 (Figura 12a), observamos uma maior concentração dos espécimes de *Ophiodes fragilis* (sp. 2) nos valores positivos de PC1 e PC2; enquanto *Ophiodes cf. fragilis* (sp. 1) se concentrou em valores negativos de PC1 e PC2 (Figura 12b). O PC1 explicou 63,4% e o PC2 13,2% da variação da amostra, com um percentual acumulativo (PC1 + PC2) de 76,6%. O comprimento rostro-cloacal se distinguiu das demais

variáveis analisadas, mostrando tendência a valores positivos em PC1 e negativos em PC2. Os valores do membro vestigial tenderam a próximo de zero. Enquanto as variáveis da cabeça (altura e largura da cabeça e distância entre as narinas) tenderam a valores positivos de PC1 e PC2. As variáveis da cabeça e do membro vestigial se correlacionaram positivamente entre si e negativamente ao comprimento rostro-cloacal (Figura 12a). Em PC1 a variável que mais contribuiu para a variação dentro da amostra foi a largura da cabeça seguida pela altura da cabeça, distância entre as narinas, comprimentos do membro vestigial e rostro-cloacal (Figura 12c). Quando somadas as variações em PC1 e PC2, a variável que mais contribuiu foi o comprimento rostro-cloacal seguido pela altura e largura da cabeça, distância entre as narinas e comprimento do membro vestigial (Figura 12d).

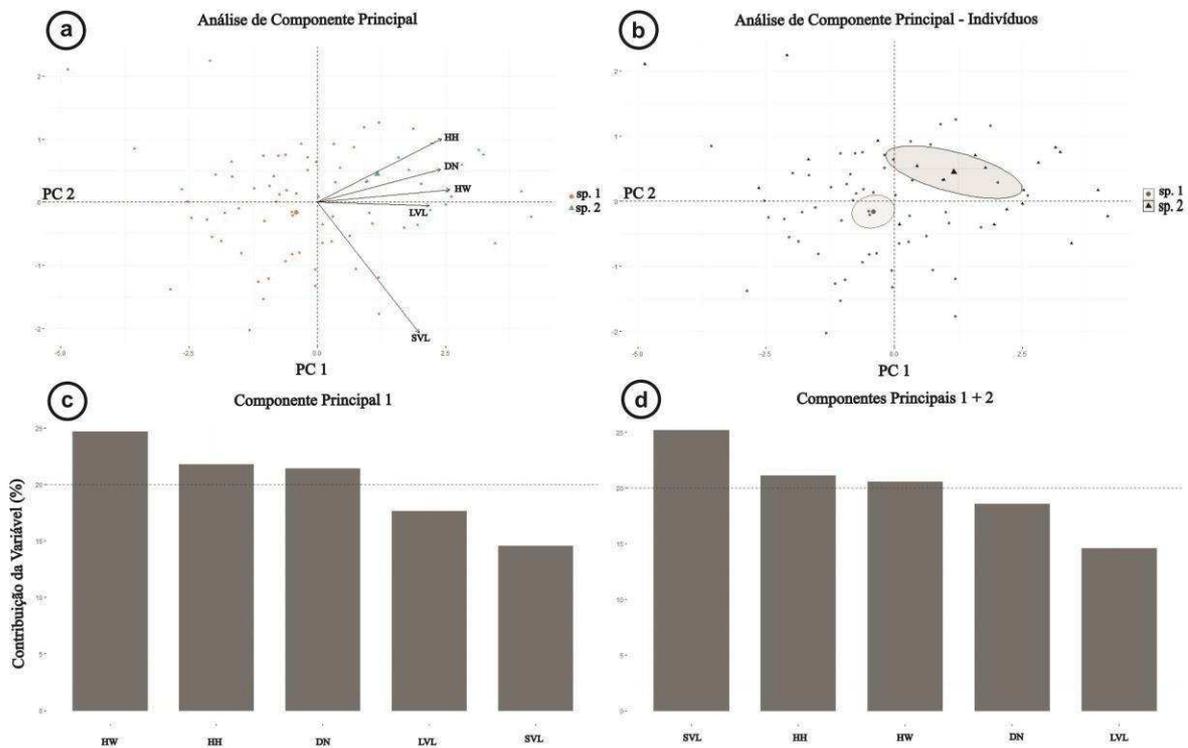


Figura 12: (a, b) Gráficos da Análise de Componente Principal (PCA) das medidas comprimento-rostro-cloacal (SVL), largura da cabeça (HW), altura da cabeça (HH), distância entre as narinas (DN) e comprimento do membro vestigial (LVL) de espécimes de *Ophiodes cf. fragilis* (sp. 1, rosa/cinza) e *Ophiodes fragilis* (sp. 2, azul/preto) (n = 77). (c, d) Gráficos da contribuição das variáveis analisadas (em porcentagem, %) nos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2)

3.2- Morfometria Geométrica

Escamas dorsal (n = 51, sendo 20 fêmeas e 31 machos) e lateral (n = 47, sendo 16 fêmeas e 31 machos) da cabeça e o formato dos membros vestigiais (n = 38, sendo 14 fêmeas e 24 machos) de *Ophiodes cf. fragilis* foram analisadas para verificar a existência de dimorfismo sexual dentro da amostra.

A Análise de Componente Principal (PCA) de escamas dorsais da cabeça (Figura 13) indicou que o componente principal 1 (PC1) explicou 24% e o componente principal 2 (PC2) explicou 18% da variação observada dentro da amostra, com um percentual acumulativo dos componentes principais 1 e 2 de 42%. Tanto as fêmeas quanto os machos se distribuíram mais homogeneamente nos valores positivos de PC1 e de PC2 (Figura 13). PC1 e PC2 indicaram uma tendência de achatamento da escama interparietal e alargamento na base da escama frontal (Figura 13).

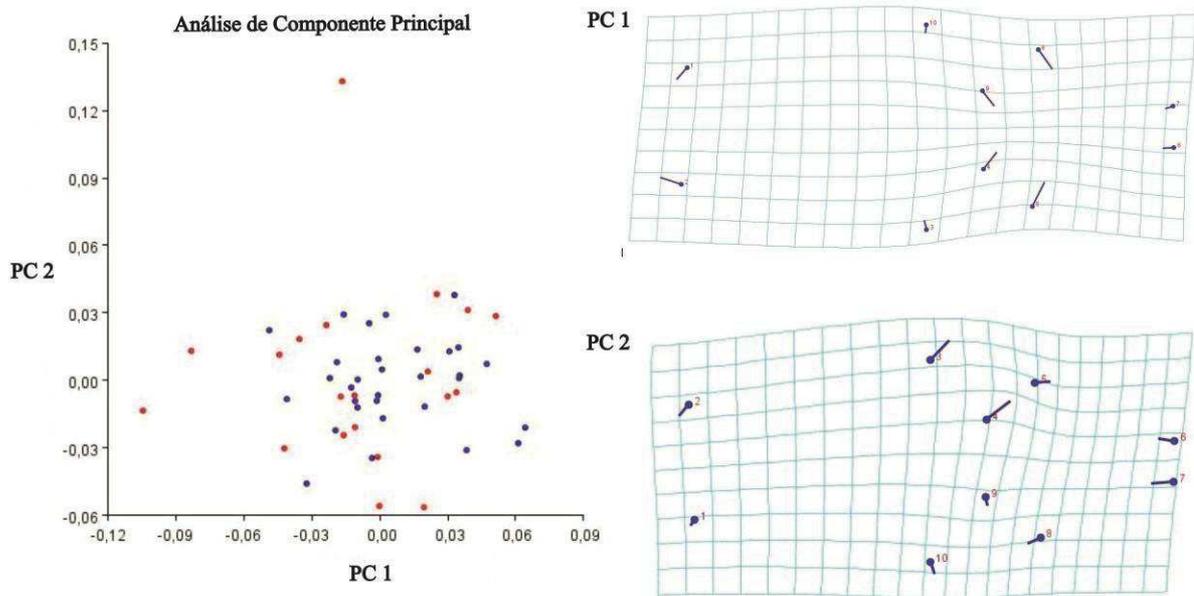


Figura 13: Gráfico da Análise de Componente Principal (PCA) mostrando a distribuição de valores da amostra no componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2) – fêmeas em vermelho e machos em azul – de escamas dorsais da cabeça de *Ophiodes cf. fragilis* (n = 51). Vetores em PC1 e PC2 indicando a tendência de achatamento da escama interparietal e alargamento na base da escama frontal.

Nas escamas laterais da cabeça (Figura 14) o PC1 explicou 34% enquanto o PC2 explicou 26% da variação observada, com um percentual acumulativo (PC1 + PC2) de 60%. Os espécimes de ambos os sexos se distribuíram homogeneamente nos valores positivos e negativos de PC1 e PC2 (Figura 14). PC1 indicou uma tendência ao achatamento na porção superior da escama rostral e inferior da escama nasal somado ao alargamento nas porções superiores da escama nasal e 1° supralabial (Figura 14). PC2 diferiu de PC1 ao indicar a tendência de alargamento da porção superior da escama rostral (Figura 14).

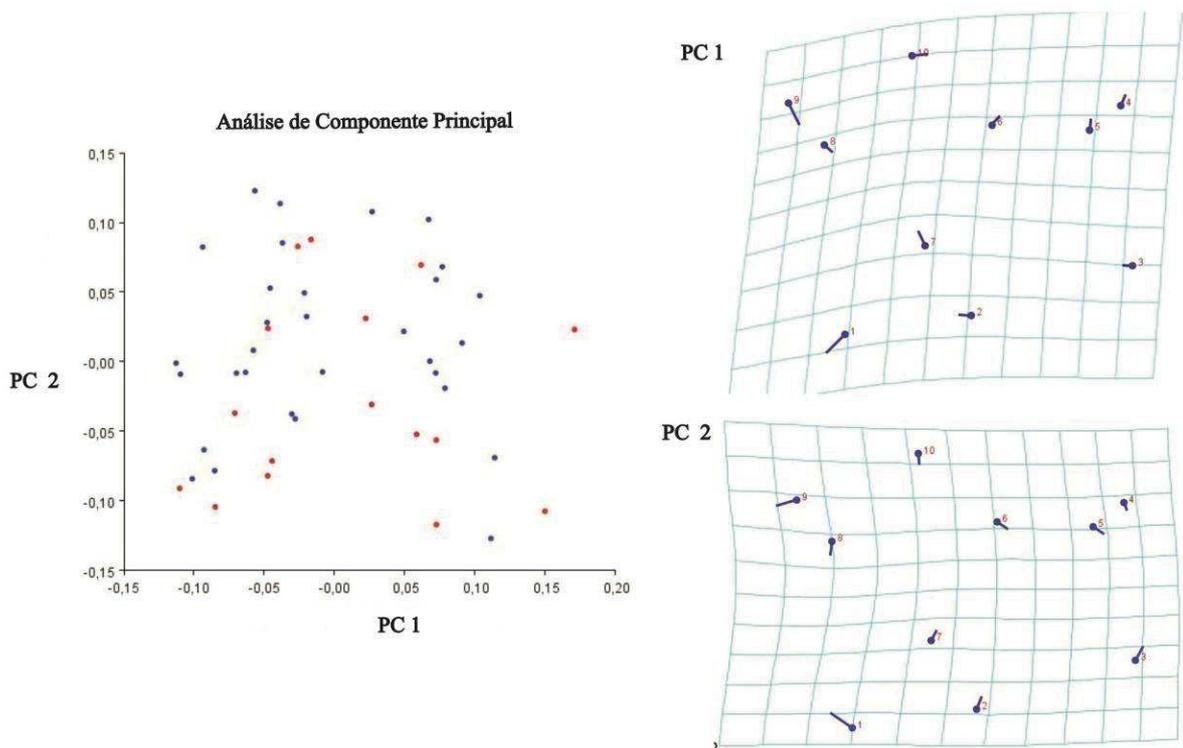


Figura 14: Gráfico da Análise de Componente Principal (PCA) mostrando a distribuição de valores da amostra no componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2) – fêmeas em vermelho e machos em azul – de escamas laterais da cabeça de *Ophiodes cf. fragilis* (n = 47). Vetores em PC1 indicando a tendência ao achatamento na porção superior da escama rostral e inferior da escama nasal somado ao alargamento nas porções superiores da escama nasal e 1° supralabial; e em PC2 indicando a tendência de alargamento da porção superior da escama rostral.

A variação da forma observada no membro vestigial (Figura 15) foi explicada 51% pelo PC1 e 28% pelo PC2, com um percentual acumulativo de 79%. Os valores da amostra se distribuíram homogeneamente, se concentrando principalmente nos pontos negativos de PC1 e positivos de PC2 (Figura 15). PC1 apontou uma tendência ao achatamento do ponto interno (próximo a cloaca) e alargamento do ponto externo, ambos superiores, do membro vestigial; com PC2 indicando a tendência oposta a observada em PC1 (Figura 15).

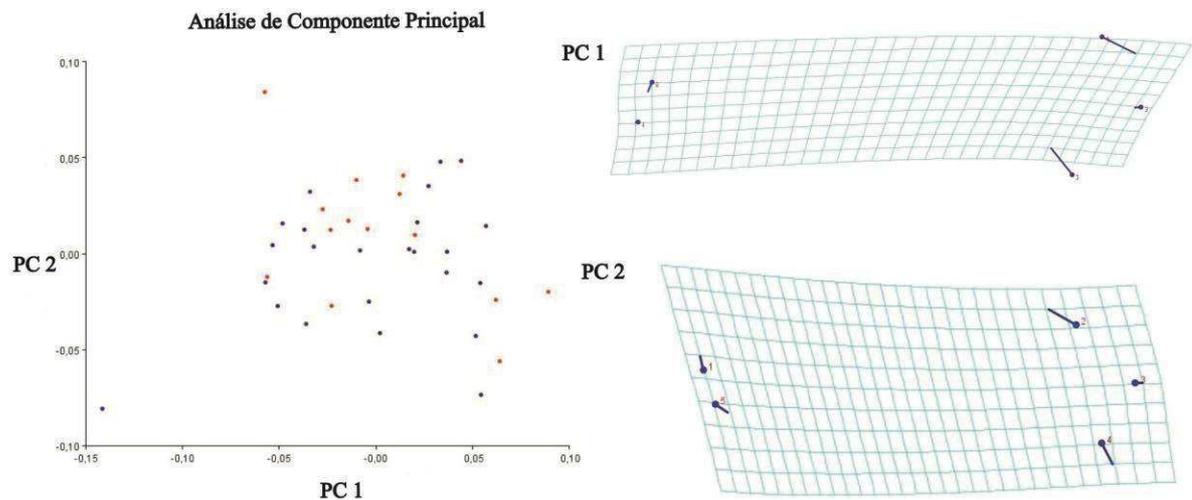


Figura 15: Gráfico da Análise de Componente Principal (PCA) mostrando a distribuição de valores da amostra no componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2) – fêmeas em vermelho e machos em azul do formato do membro vestigial de *Ophiodes* cf. *fragilis* (n = 38). Vetores em PC1 indicaram a tendência ao achatamento do ponto interno (próximo a cloaca) e alargamento do ponto externo, ambos superiores; e em PC2 indicando a tendência oposta.

A Análise de Função Discriminante (DFA) das escamas dorsais da cabeça confirmaram a ausência de variação significativa entre machos e fêmeas ($p = 0,107$); a qual também foi confirmada nas análises de escamas laterais ($p = 0,069$) e pelo formato do membro vestigial ($p = 0,919$) (Figura 16).

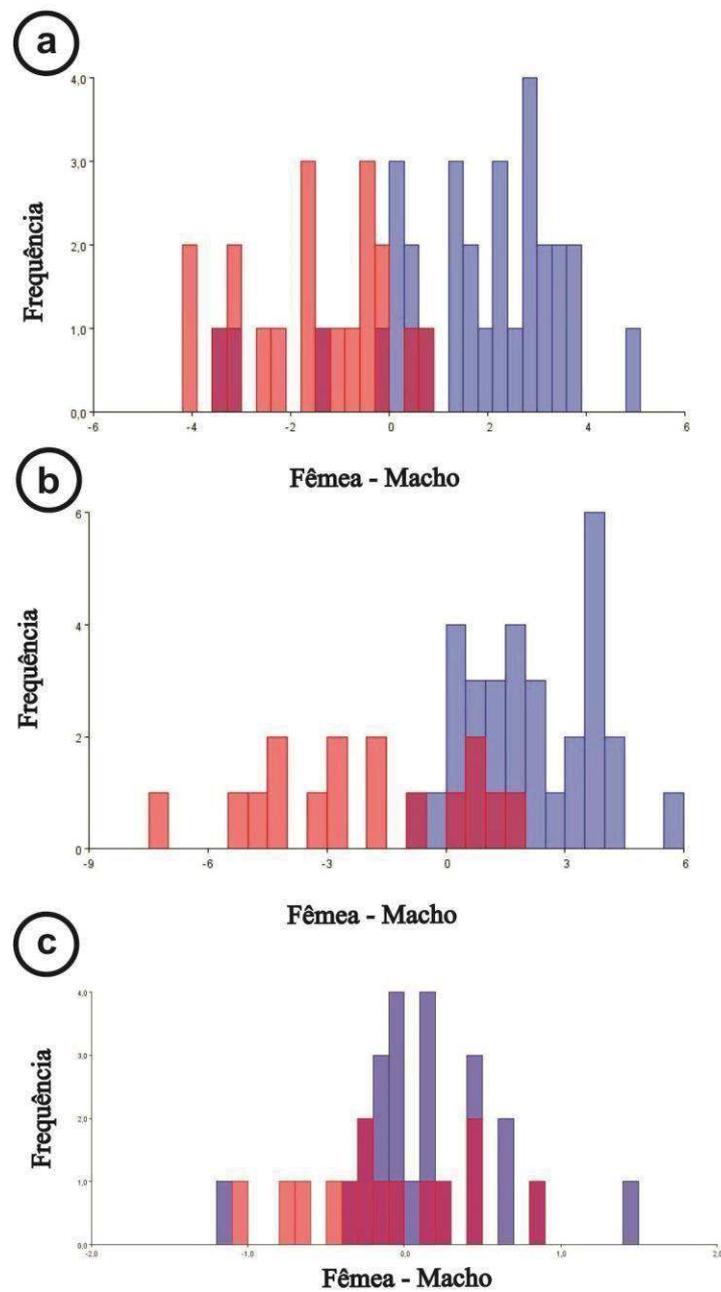


Figura 16: Gráfico da Análise de Função Discriminante (DFA) de escamas dorsais (a - n = 51) e laterais (b - n = 47) da cabeça e do formato do membro vestigial (c - n = 38) de *Ophiodes cf. fragilis*. Fêmeas em vermelho e machos em azul.

A investigação da variação interespecífica foi feita com a análise de escamas dorsais ($n = 71$, 51 *Ophiodes cf. fragilis* e 20 *O. fragilis*) e laterais ($n = 66$, 47 *Ophiodes cf. fragilis* e 19 *O. fragilis*) da cabeça e com o formato do membro vestigial ($n = 49$, 37 *Ophiodes cf. fragilis* e 12 *O. fragilis*) dos espécimes de *Ophiodes* analisados.

A variação das escamas dorsais da cabeça analisadas foi explicada 30,54% pelo PC1 e 13,33% pelo PC2, resultando em um percentual acumulativo de 43,87%. Não foi observado agrupamento evidente entre os espécimes de *Ophiodes cf. fragilis* e *O. fragilis*; entretanto os pontos de *Ophiodes cf. fragilis* se concentraram em valores positivos de PC1 e próximos a zero em PC2 e os pontos de *Ophiodes fragilis* em valores negativos de PC1 e negativos de PC2 (Figura 17). A análise da forma em PC1 indicou a tendência de alargamento na base da escama frontal e achatamento da base da escama interparietal (Figura 17). PC2 se diferiu de PC1 ao indicar uma tendência ao achatamento da base da escama frontal e alargamento da porção superior da escama interparietal (Figura 17).

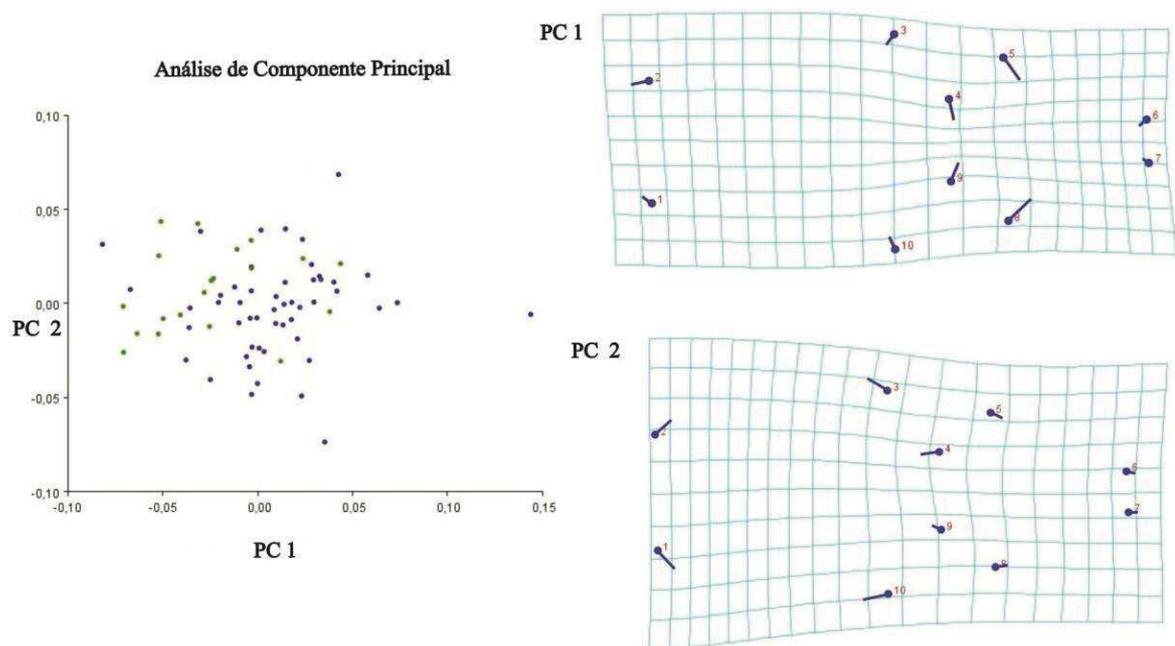


Figura 17: Gráfico da Análise de Componente Principal (PCA) mostrando a distribuição de valores da amostra no componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2) – *Ophiodes cf. fragilis* (azul) e *Ophiodes fragilis* (verde) ($n = 71$) – na análise interespecífica da variação de escamas dorsais da cabeça. Vetores em PC1 indicaram a tendência de alargamento na base da escama frontal e achatamento da base da escama interparietal. Vetores em PC2 indicaram a tendência ao achatamento da base da escama frontal e alargamento da porção superior da escama interparietal.

A análise de variação da forma das escamas laterais da cabeça mostrou PC1 explicando 34,29% e PC2 24,78% da variação observada, com percentual acumulativo de 59,07%. Os pontos de *Ophiodes cf. fragilis* e *Ophiodes fragilis* se distribuíram homogeneamente dentro dos valores positivos e negativos de PC1 e PC2, sem agrupamento ou concentração evidente (Figura 18). Foi identificada uma tendência ao achatamento da porção superior da escama rostral e alargamento da porção inferior desta mesma escama em PC1; no entanto, o contrário foi observado em PC2 para a escama rostral e o alargamento das escamas nasal e 1° supralabial (Figura 18).

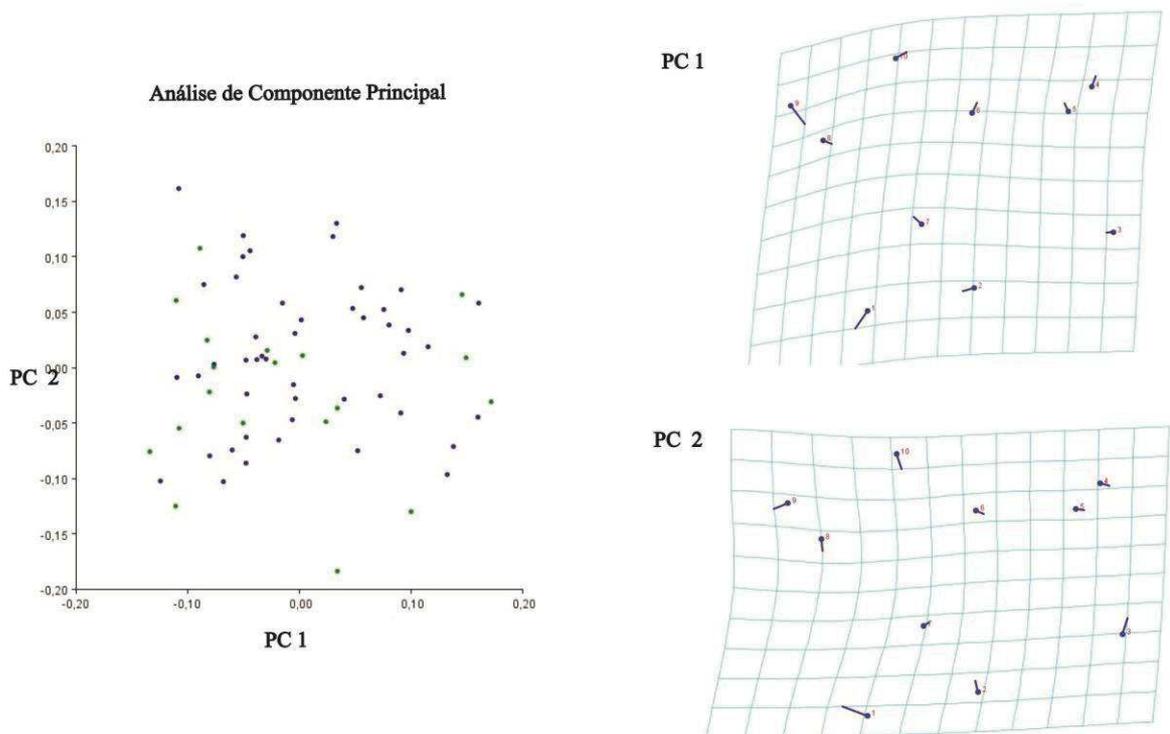


Figura 18: Gráfico da Análise de Componente Principal (PCA) mostrando a distribuição de valores da amostra no componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2) – *Ophiodes cf. fragilis* (azul) e *Ophiodes fragilis* (verde) (n = 66) – na análise interespecífica da variação de escamas laterais da cabeça. Vetores em PC1 indicaram a tendência ao achatamento da porção superior da escama rostral e alargamento da porção inferior desta mesma escama; em PC2 os vetores indicaram tendência contrária a observada em PC1 para a escama rostral e o alargamento das escamas nasal e 1° supralabial.

O componente principal 1 explicou 56,55% e o PC2 23,94% da variação observada no formato dos membros vestigiais de *Ophiodes cf. fragilis* e *Ophiodes fragilis*, acumulando o percentual de 80,49% da explicação da variação da amostra. Os pontos de *Ophiodes cf. fragilis* e *Ophiodes fragilis* não agruparam por espécie, mas podemos observar uma concentração dos pontos de *Ophiodes cf. fragilis* em valores negativos de PC1 e positivos de PC2 e de *Ophiodes fragilis* em valores positivos de PC1 e negativos de PC2 (Figura 19). PC1 indicou a tendência ao achatamento do ponto interno (próximo a cloaca) e alargamento do ponto externo, ambos superiores, do membro vestigial; com PC2 indicando a tendência do alargamento dos pontos internos e externos superiores marcados (Figura 19).

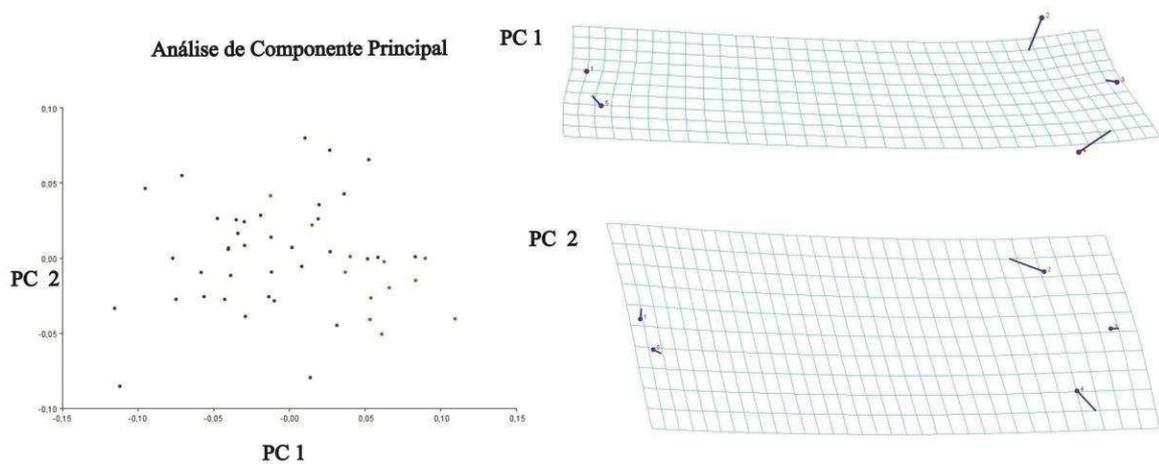


Figura 19: Gráfico da Análise de Componente Principal (PCA) mostrando a distribuição de valores da amostra no componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2) – *Ophiodes cf. fragilis* (azul) e *Ophiodes fragilis* (verde) (n = 49) – na análise interespecífica da variação do formato do membro vestigial. Os vetores em PC1 indicaram a tendência ao achatamento do ponto interno (próximo a cloaca) e alargamento do ponto externo, ambos superiores, do membro vestigial; com vetores em PC2 indicando a tendência do alargamento dos pontos internos e externos superiores marcados.

A variação das escamas dorsal ($p = 0,0091$) e lateral ($p = 0,0521$) entre *Ophiodes cf. fragilis* e *Ophiodes fragilis* não foi significativa. Contudo, foi constatada variação significativa no formato do membro vestigial ($p = <0,0001$) entre as espécies analisadas (Figura 20).

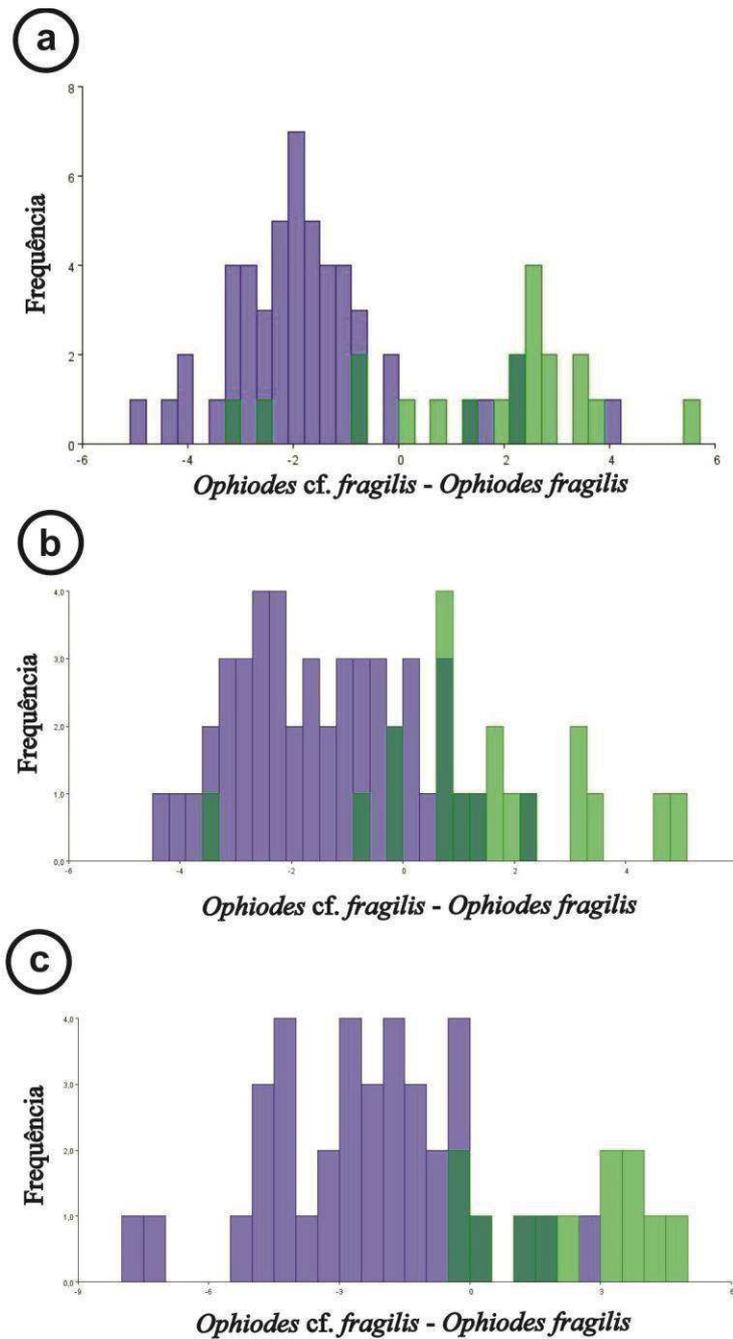


Figura 20: Gráfico da Análise de Função Discriminante (DFA) de escamas dorsais (a - n = 71) e laterais (b - n = 66) da cabeça e do formato do membro vestigial (c - n = 49) interespecífica entre *Ophiodes cf. fragilis* (azul) e *Ophiodes fragilis* (verde).

4- DISCUSSÃO

A análise das medidas aferidas do corpo, da cabeça, do membro vestigial, de escamas da cabeça e o formato do membro vestigial mostrou ausência de dimorfismo sexual em

Ophiodes cf. fragilis, sendo não significativa a variação na forma e tamanho encontrada. A variação interespecífica associada a forma e tamanho entre *Ophiodes cf. fragilis* e *O. fragilis* demonstrou ser significativa por ambas as técnicas utilizadas. As variações relacionadas ao tamanho do corpo, cabeça e membro vestigial foram altamente significativas através da técnica de morfometria linear para diferenciar as espécies. Na análise de morfometria geométrica o destaque foi para o formato do membro vestigial, apresentando diferença significativa entre as espécies.

A ausência de dimorfismo sexual foi constatada anteriormente por Oliveira et al. (2021) ao analisar a variação sexual relacionado ao tamanho do corpo, cabeça e membro vestigial através da técnica de morfometria linear em uma espécie de *Ophiodes*. Entretanto, estudos anteriores com diferentes espécies de *Ophiodes*, também utilizando análises baseadas em dados de morfometria linear, demonstraram diferenças significativas entre machos e fêmeas relacionadas ao tamanho e forma do corpo, da cabeça e do membro vestigial (PIZZATO, 2005; BARROS e TEIXEIRA, 2007; MONTECHIARO et al., 2011; ORTIZ et al., 2017). A técnica de morfometria geométrica foi utilizada pela primeira vez para o estudo de dimorfismo sexual em uma espécie de *Ophiodes*; e, ao realizar uma investigação mais profunda da variação da forma (MITTROECKER e GUNZ, 2009), confirmou o resultado obtido através dos dados de morfometria linear.

As espécies do gênero *Ophiodes* apresentam pouca variação morfológica, sendo muito semelhantes quanto ao formato do corpo, coloração e forma e tamanho das escamas dorsais e ventrais (BORGES-MARTINS, 1998). A variação na forma de escamas em *Ophiodes* é tão sutil, que mesmo quando constatada pode não diferenciar espécies ou populações, como foi observado por Oliveira et al. (2016). A existência de pouca ou nenhuma variação no formato e tamanho de variáveis da cabeça, do corpo e escamas da cabeça observada em nosso estudo pode resultar diretamente dessa similaridade morfológica anteriormente descrita entre as espécies de *Ophiodes*.

Os caracteres frequentemente utilizados para diagnose de espécies desse gênero se concentram principalmente em contagem de escamas da região da cabeça e do membro vestigial (CACCIALI e SCOTT, 2015; ENTIAUSPE-NETO et al., 2017). Borges-Martins (1998) relata que os membros vestigiais de *Ophiodes fragilis* possuem de 6 a 10 escamas; enquanto para *Ophiodes cf. fragilis* (= *Ophiodes* sp. 2) o número de escamas nos membros vestigiais seria de 5 a 6. Membros vestigiais com mais escamas possivelmente apresentam tamanhos maiores, o que pôde ser observado visualmente entre as espécies analisados e confirmada a diferença entre o tamanho e a forma pelas análises realizadas.

A morfometria geométrica tem se mostrado uma grande aliada para estudos taxonômicos, usualmente está acompanhada de outras análises como exames de características morfológicas (ver RUANE, 2015). Contudo, os resultados também são extremamente confiáveis quando utilizada de forma isolada (como REJ e MEAD, 2017). O uso da morfometria geométrica tem aumentado devido a fatores que, quando comparada a morfometria linear, apresenta uma medição menos invasiva e análises de variações morfológicas mais precisas (MITTROECHER e GUNZ, 2009; BENÍTEZ e PÜSCHEL, 2014). A comparação das duas metodologias demonstra ser uma forma de verificação da valia de cada método. Em um estudo com *Podarcis bocagei* (Lopez-Seoane, 1885) ambos os métodos foram utilizados para investigar a variação intraespecífica associada ao hábitat, comparando diferentes populações (KALIONTZOPOULOU et al., 2010). Esta estratégia, de análise conjunta das morfometrias linear e geométrica, também foi empregada para o estudo de dimorfismo sexual analisando o formato da cabeça de *Salvator merianae* (FABRE et al., 2014). Tanto no estudo com *P. bocagei* quanto com *S. merianae*, as análises das morfometrias linear e geométrica demonstraram ser eficazes para detectar as diferenças sexuais e intraespecíficas. As análises realizadas com ambas as técnicas demonstraram a ausência de dimorfismo sexual em *Ophiodes cf. fragilis*. De forma complementar, nossos resultados servem de exemplo da aplicabilidade conjunta das técnicas de morfometria linear e morfometria geométrica como um método para análise de variação interespecífica, inclusive em espécies morfológicamente conservadas, como as do gênero *Ophiodes*.

A identificação da existência ou não de dimorfismo sexual e como o mesmo pode ser definido em uma espécie é de extrema importância para estudos ecológicos e comportamentais. A ausência de variação sexual na forma e tamanho em *Ophiodes cf. fragilis* estimula a discussão sobre a presença de dimorfismo sexual em todas as espécies de *Ophiodes* e Anguidae; indicando o dimorfismo sexual associado ao tamanho (fêmeas com corpos maiores e machos com cabeças maiores) ser majoritário entre as espécies do gênero, mas não um “padrão” da família. As análises morfométricas, tanto a linear quanto a geométrica, mostraram ser importantes aliadas para a diferenciação entre espécies, até mesmo em espécies com poucas variações morfológicas evidentes. Nossos resultados confirmam que os espécimes analisados de *Ophiodes cf. fragilis* e *Ophiodes fragilis* se diferenciam em duas espécies distintas. Ressaltamos que estudos complementares, como análises moleculares, são necessários para elucidação taxonômica no gênero.

CAPÍTULO II

Caracterização morfológica do sistema urogenital e suas aplicações ecológicas em *Ophiodes cf. fragilis* (Raddi, 1820) (Squamata: Anguidae) do sudeste do Brasil

1- INTRODUÇÃO

A reprodução se destaca entre as estratégias ecológicas e biológicas de uma espécie; sendo a forma de transmissão de genes para a próxima geração (BRAZ et al., 2019). Compreender a biologia reprodutiva de uma espécie é determinante na projeção e implementação de métodos eficazes de conservação (SHINE e BONNET, 2009). O sistema reprodutor de Squamata apresenta a anatomia básica dos demais vertebrados, com um par de ovários e ovidutos nas fêmeas e um par de testículos, epidídimos e ductos deferentes nos machos (ROCHA-BARBOSA et al., 2015). A particularidade em Squamata é o posicionamento de ovário/testículo direito comumente um pouco superior ao esquerdo (ROCHA-BARBOSA et al., 2015).

Características morfológicas e fisiológicas relacionadas a reprodução em Squamata são especialmente interessantes pela grande variedade de adaptações. Dentro do grupo dos lagartos, serpentes e anfisbenas observamos espécies com o modo reprodutivo ovíparo, vivíparo lecitotrófico (também denominado ovovivíparo) e vivíparo placentotrófico (ROCHA-BARBOSA et al., 2015; BLACKBURN, 2015). Em algumas espécies foi observada a espermateca, sendo esta estrutura uma dobra da mucosa da região vaginal do oviduto, que tem por função o armazenamento prolongado de esperma (BLACKBURN, 1998; MELO et al., 2019). Além dos órgãos que compõem o sistema reprodutor em Squamata é importante ressaltar o segmento sexual renal, uma estrutura originada da hipertrofia de uma região do néfron e/ou ureter, que está normalmente ausente em fêmeas e machos imaturos de Squamata, a qual é associada diferentes funcionalidades relacionadas à reprodução (RHEUBERT et al., 2014; NOVELLI et al., 2018). Desta forma, ao estudar a morfologia de órgãos relacionados a reprodução podemos compreender algumas características reprodutivas como maturidade sexual, atividade reprodutiva e modo reprodutivo.

Os lagartos do gênero *Ophiodes* Wagler, 1828 (Squamata, Anguidae, Diploglossinae), popularmente conhecidos como cobras-de-vidro, lagartos-de-vidro ou quebra-quebra, são exclusivamente neotropicais e se distribuem ao leste dos Andes, na porção central, no leste e

sudeste da América do Sul (BORGES-MARTINS, 1998; CACCIALI e SCOTT, 2012,2015; ENTIAUSPE-NETO et al., 2017). São vivíparos lecitotróficos, ou seja, não existe uma conexão placentária evidente entre mãe e embrião e a nutrição ocorre através de gemas de vitelo (BARROS e TEIXEIRA, 2007; MONTECHIARO et al., 2011; ORTIZ et al., 2017). As espécies de *Ophiodes* apresentam também como características a cabeça pequena e pontiaguda, cauda e corpo alongados, membros anteriores ausentes e posteriores rudimentares (PIZZATO, 2005; OLIVEIRA et al., 2016).

Atualmente, o gênero *Ophiodes* é composto por sete espécies: *Ophiodes fragilis* (Raddi, 1820); *Ophiodes striatus* (Spix, 1825); *Ophiodes yacupoi* Gallardo, 1966; *Ophiodes vertebralis* Bocourt, 1881; *Ophiodes intermedius* Boulenger, 1894; *Ophiodes luciae* Cacciali e Scott, 2015 e *Ophiodes enso* (ENTIAUSPE-NETO et al., 2017; UETZ et al., 2021). Borges-Martins (1998) ainda destaca a existência de outras três espécies candidatas: *Ophiodes* sp. “1”; *Ophiodes* sp. “2” e *Ophiodes* sp. “3”. A similaridade morfológica observada entre as espécies anteriormente descritas de *Ophiodes* somado a inexistência de estudos taxonômicos com o gênero, reforça a hipótese de que o mesmo abrigue mais espécies do que as já conhecidas (BORGES-MARTINS, 1998; CACCIALI e SCOTT, 2015). Este fato influencia diretamente em informações sobre *status* de conservação das espécies de *Ophiodes*, estando presentes apenas duas das sete espécies (*Ophiodes striatus* e *Ophiodes intermedius*) na lista da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) (2021), ambas consideradas “pouco preocupantes” (LC). O ICMBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) possui os dados somente de *Ophiodes striatus*, sendo esta ainda considerada uma sinonímia com *Ophiodes fragilis*, e apresenta o *status* de “dados insuficientes” (DD) (COLLI et al., 2016). Os autores da última espécie descrita, *Ophiodes enso*, propõem que a mesma seja considerada “criticamente em perigo” (CR) (ENTIAUSPE-NETO et al., 2017); entretanto, até a presente data, não há um documento oficial sobre o *status* de conservação que contemple esta classificação, assim como uma atualização com as demais espécies do gênero.

Estudos com *Ophiodes*, de maneira geral no Brasil, se resumem a informações locais principalmente sobre aspectos da dieta e biologia reprodutiva, além de levantamentos de herpetofauna (ROCHA-BARBOSA et al., 1991; PIZZATTO, 2005; BERNARDO e PIRES, 2006; BARROS e TEIXEIRA, 2007; BARBO, 2008; SALLES e SILVA-SOARES, 2010; MONTECHIARO et al., 2011; ZAHER et al., 2011; NOVELLI et al., 2011, 2012; SOUSA et al., 2010, 2012; TRINDADE et al., 2013; LUCAS et al., 2016). Dentre os estudos sobre biologia reprodutiva destacam-se informações referentes ao tempo de gestação, tamanho da ninhada e tamanho mínimo de fêmeas e neonatos (ROCHA-BARBOSA et al., 1991; BERNARDO e

PIRES, 2006; BARROS e TEIXEIRA, 2007; MONTECHIARO et al., 2011; TRINDADE et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2021), inexistindo dados morfológicos do sistema urogenital e mecanismos relacionados à reprodução. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi analisar e descrever a morfologia de órgãos do sistema urogenital relacionados a reprodução de espécimes de *Ophiodes* cf. *fragilis*, avaliando as possíveis variações relacionadas a populações e épocas do ano em que foram coletados. Destacamos que os espécimes utilizados neste estudo apresentaram características da espécie candidata *Ophiodes* sp. 2 (BORGES-MARTINS, 1998). No entanto, pelos espécimes apresentarem, entre as espécies oficialmente descritas, maior semelhança morfológica a *Ophiodes fragilis*, decidimos nomeá-la como *Ophiodes* cf. *fragilis*.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Ao todo foram analisados 43 espécimes de *Ophiodes* cf. *fragilis*, sendo 24 machos (22 adultos e 02 juvenis) e 19 fêmeas (13 adultas, 01 juvenil e em 05 não foi possível estimar a idade devido a artefatos de fixação do material), pertencentes a Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Juiz de Fora – Répteis (CHUFJF-Répteis). A idade foi estimada através da análise macroscópica e microscópica das gônadas. Esses espécimes foram coletados em estudos anteriores entre os anos de 2000 e 2015 em diferentes municípios do estado de Minas Gerais – Brasil (Figura 21).

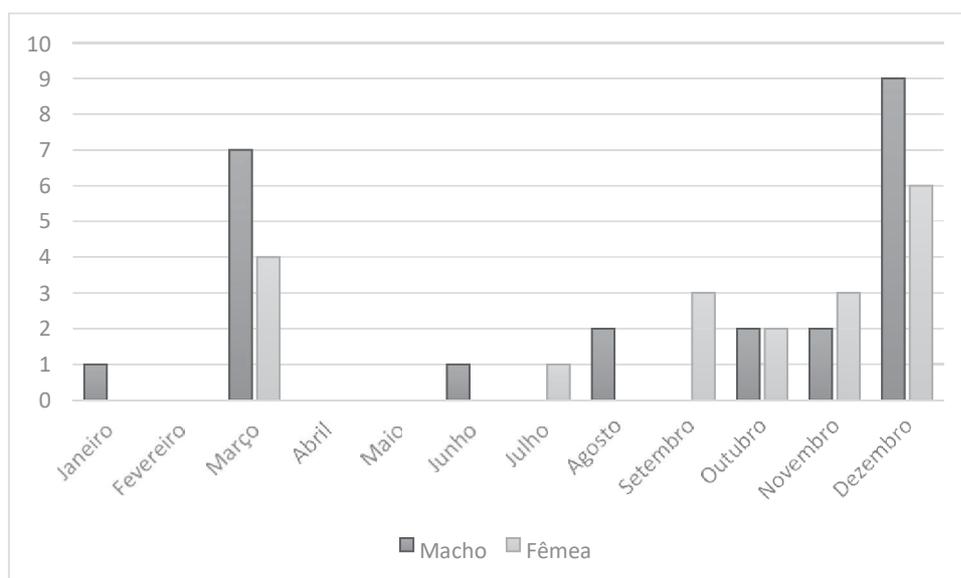


Figura 21: Meses em que foram coletados e número amostrado de espécimes de *Ophiodes* cf. *fragilis* analisados no presente estudo.

Durante a necropsia dos espécimes, foi retirada a porção esquerda do sistema urogenital para processamento histológico. Antes do processamento, a amostra foi clivada de forma a processar separadamente os testículos (com epidídimos), ovários (com ovidutos, porção inicial e mediana) e rins (com porção final do oviduto e ducto deferente).

A preparação histológica foi realizada de acordo com a técnica de processamento de rotina: desidratação em concentrações crescentes de álcool, diafanização em xilol e impregnação com parafina. Posteriormente, as amostras foram embebidas em parafina, para confecção dos blocos histológicos, e os mesmos foram submetidos a cortes seriados de 4 μ m a 7 μ m de espessura de acordo com o material (TOLOSA et al., 2003). As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE); as colorações de ácido periódico de Schiff (PAS), azul de Alcian pH 2,5% (RHEUBERT et al., 2011) e tricrômio de Masson foram utilizadas para analisar a possível composição secretória do segmento sexual renal. A análise do material e a respectiva fotodocumentação foi realizada em microscópio Olympus BX41 com equipamento fotográfico digital Canon A3100S e ocular micrométrica acoplados ao referido microscópio.

3- RESULTADOS

As características macro e microscópicas do sistema urogenital de *Ophiodes cf. fragilis* não variaram com relação à localidade de coleta. Desta forma, a descrição foi feita a nível geral da espécie. Dos 24 machos processados, foi possível analisar os rins e testículos de 19 espécimes, epidídimos de 14 espécimes e ductos deferentes de 08 espécimes. Já entre as 19 fêmeas processadas, analisamos os rins de 13 espécimes, ovidutos de 12 espécimes e ovários de 09 espécimes. As demais amostras apresentaram-se em má qualidade para análise após o processamento histológico. O maior número de espécimes machos foram coletados nos meses de março (n = 07) e dezembro (n = 09) e de fêmeas no mês de dezembro (n = 06) (Figura 21). Entre os espécimes analisados houve a predominância de indivíduos adultos (91,66 % e 63,15%, machos e fêmeas respectivamente).

Macroscopicamente, o sistema urogenital se apresentou de forma regular, com os órgãos pares do lado direito superiores anatomicamente aos do lado esquerdo (Figura 22). Quanto à morfologia externa, os ovários e testículos têm forma ovular, com a porção apical mais larga e arredondada enquanto a porção basal é mais afilada. Os epidídimos seguiram o formato ovular dos testículos, se apresentado justapostos a estes. Os ovidutos têm de formato afilado e alongados, e inicia na porção mediana/basal dos ovários; em alguns espécimes foi possível

constatar o enovelamento desta estrutura. Os rins são alongados e lobulados; os ovidutos e ductos deferentes seguiram justapostos a esta estrutura até a região cloacal.

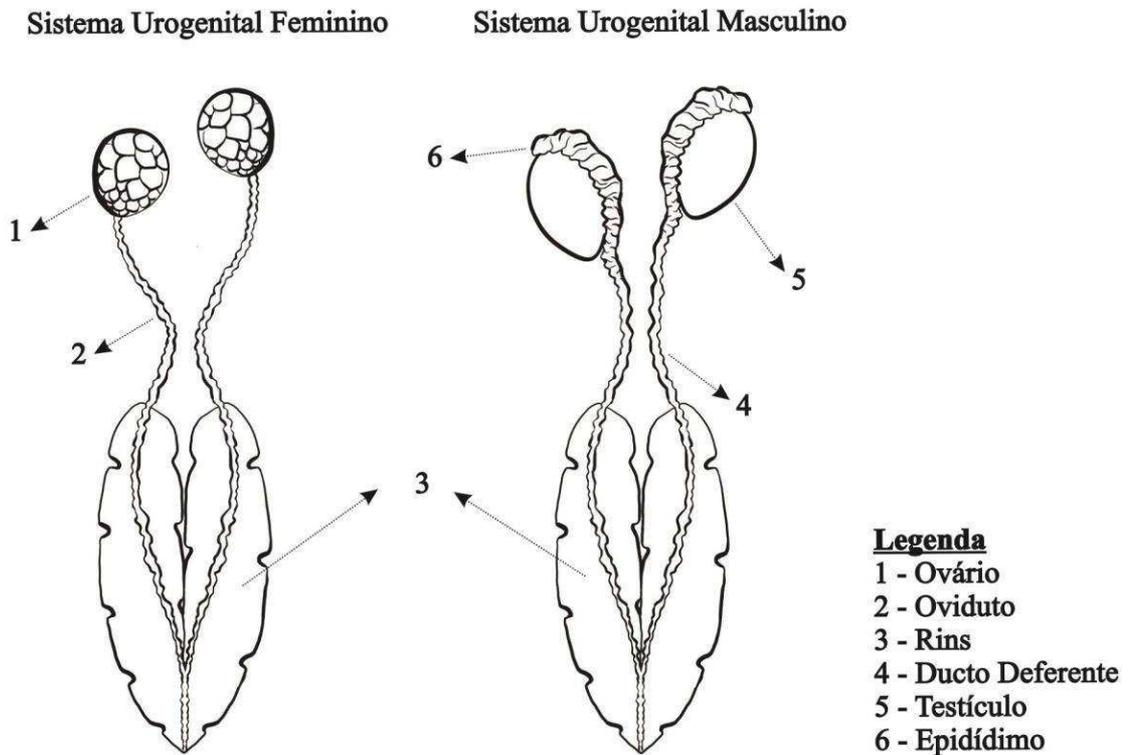


Figura 22: Desenho esquemático do sistema urogenital de *Ophiodes cf. fragilis*.

Os ovários são envolvidos pela cápsula de tecido conjuntivo vascularizado, com retração artefactual. Todas as fêmeas analisadas possuíam folículos em desenvolvimento, estando ausentes folículos maduros. Também foi identificado folículos atresícos e corpo lúteo bem definidos (Figura 23a,b,c). A camada folicular mais externa é a teca, caracterizada nos folículos observados de *Ophiodes cf. fragilis* como uma fina camada de células de núcleos achatados. Após a teca, foi observada uma espessa camada granulosa composta por células de diferentes tamanhos; as maiores células (piriformes) se diferenciaram por núcleos grandes e claros e nucléolos evidentes. A terceira camada observada foi a fina e homogênea zona pelúcida. O ooplasma era abundante com o núcleo bem delimitado e cromossomos evidentes em seu interior. Os folículos atresícos se caracterizaram pelo emaranhado de células foliculares fagocíticas, de formato irregular, com células sanguíneas no seu interior, originando o coágulo central, e envolvidas por células tecais e da camada granulosa. Em fase mais avançada, os folículos atresícos apresentaram lúmen reduzido e aparência de células apoptóticas (Figura 24a). O corpo lúteo se caracterizou morfológicamente por um enovelado celular em estágio de

luteólise, com células luteais hipertrofiadas e núcleos picnóticos; observado em um espécime coletado no mês de novembro (Figura 24b).

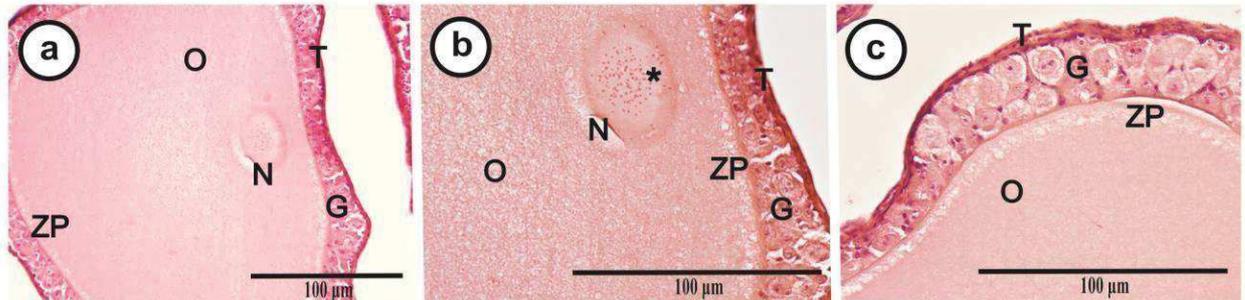


Figura 23: (a, b, c) Microfotografias dos folículos em desenvolvimento observados nos ovários de *Ophiodes cf. fragilis* coradas com hematoxilina e eosina. T – teca; G – camada granulosa; ZP – zona pelúcida; O – ooplasma; N – núcleo; (*) – detalhe dos cromossomos no interior do núcleo. Escala: (a) 200x; (b, c) 400x.

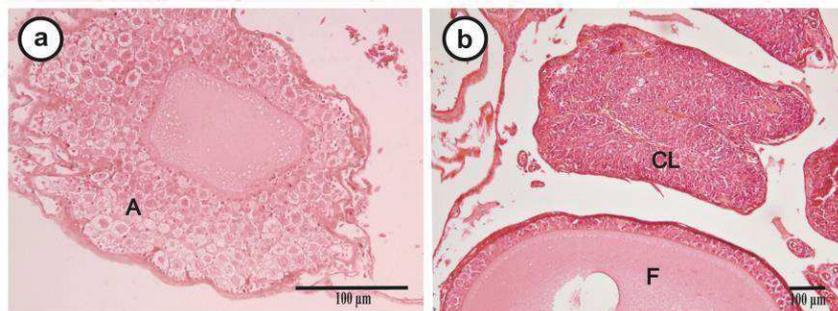


Figura 24: Microfotografias do folículo atrésico (a) e corpo lúteo (b) observados nos ovários de *Ophiodes cf. fragilis* coradas com hematoxilina e eosina. A – folículo atrésico; CL – corpo lúteo; F - folículo. Escala: (a) 200x; (b) 100x.

Os ovidutos apresentaram-se envolvidos externamente por uma escassa camada de epitélio pavimentoso simples, com regiões de diferentes intensidades de pregas (Figura 25a,b,c). Internamente, os ovidutos apresentaram uma mucosa composta por epitélio cilíndrico pseudo-estratificado com células baixas e estereocílios presentes em algumas regiões e uma camada de tecido conjuntivo escasso, porém muito vascularizado, seguida por uma camada dupla de tecido muscular liso. Foram observadas três regiões distintas no oviduto: infundíbulo, útero e vagina. O infundíbulo (Figura 25a) apresentou uma densa, porém escassa, lâmina própria com poucas glândulas presentes e revestida por epitélio ciliado, podendo a mucosa apresentar por toda a extensão uma série de pregas. A porção posterior do infundíbulo se difere

da anterior por apresentar a mucosa disposta em filas de vilosidades e uma camada muscular mais desenvolvida, sendo intermediária a porção anterior uterina. O útero (Figura 25b) foi caracterizado por uma mucosa composta de epitélio simples (ciliada e aciliada), e lâmina própria intensamente glandular (com numerosas glândulas túbulo-alveolares – glândulas da casca do ovo), seguida por uma grossa dupla camada de musculatura lisa e vascularizada. A região final do oviduto é a vagina (Figura 25c), conduz a partir do útero até a cloaca, foi caracterizada por apresentar epitélio ciliado e mucosa pregueada, com numerosas glândulas na porção anterior, uma dupla camada muscular bem desenvolvida e delimitada (camada próxima a lâmina própria composta por musculatura lisa circular, seguida por uma camada de musculatura lisa retilínea) e lúmen estreito. Não foi observada espermateca em nenhuma das regiões dos ovidutos analisados.

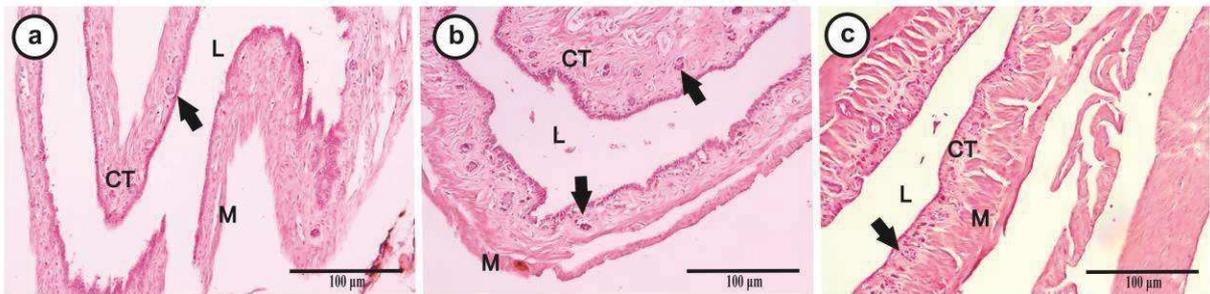


Figura 25: Microfotografias do oviduto *Ophiodes cf. fragilis* coradas com hematoxilina e eosina. (a) Região do infundíbulo, (b) região uterina e (c) região vaginal. L – lúmen; N – musculatura lisa; CT – tecido conjuntivo; seta – glândulas da casca do ovo. Escala: (a, b, c) 200x.

Os testículos se encontravam envolvidos por uma delgada túnica albugínea de tecido conjuntivo (Figura 26a,b). A retração artefactual do interstício durante o processamento histológico dificultou a identificação das células de Leydig. Os túbulos seminíferos (TS), revestidos pelo epitélio seminífero (= epitélio germinativo), eram formados pelas células germinativas (em sucessivas gerações celulares) e células de Sertoli. Nos espécimes analisados, as células germinativas se organizaram em coortes observando-se: (1) espermatogônias (células que se apresentaram mais basais, com núcleo basofílico, pouco corados); (2) espermatócitos (primários e secundários, células menores do que espermatogônias e arredondadas); (3) espermátides (células numerosas e/ou afiladas próximas do compartimento luminal); e (4) espermatozoides (presentes na borda e/ou no compartimento luminal, destacadas pelos flagelos no lúmen) (Figura 26b). Alguns espécimes coletados em março, agosto, outubro e dezembro

apresentavam apenas as células germinativas iniciais, com predomínio de espécimes apenas com espermatogônias (Figura 26a), indicando que os espécimes se encontravam em fase de regressão testicular. Apesar disto, espécimes coletados em março e dezembro apresentavam todas as gerações de células germinativas, sugerindo a fase testicular de espermiogênese.

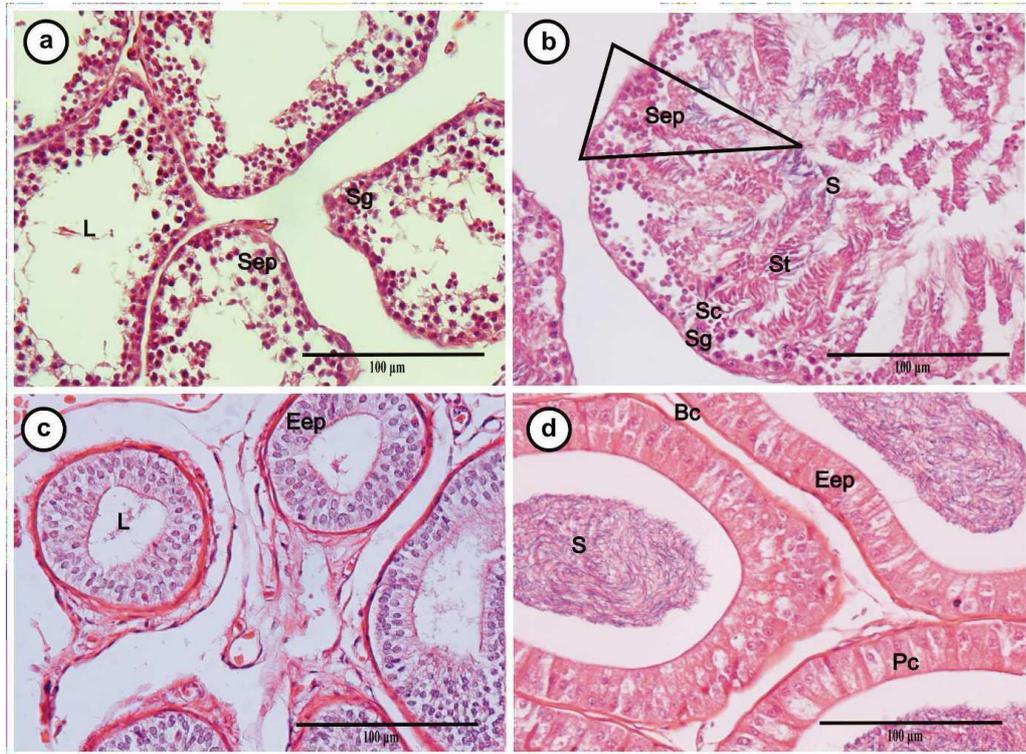


Figura 26: Microfotografias dos testículos (a,b) e epidídimos (c,d) de *Ophiodes* cf. *fragilis* coradas com hematoxilina e eosina. (a,c) Atividade não reprodutiva; (b,d) atividade reprodutiva. L – lúmen; Sep – epitélio seminífero; Sg – espermatogônia; Sc – espermatócito; St – espermatíde; S – espermatozoide; Triângulo – coorte; Eep – epitélio epididimário; Bc – células basais; Pc – células principais. Escala: 400x.

A parede do epidídimo apresentou um componente epitelial que repousa sobre a membrana basal revestida por uma fina camada de musculatura lisa. O epitélio de revestimento, classificado como pseudo-estratificado, era formado por células altas (principais) e baixas (basais), estando as células principais com estereocílios evidentes (principalmente nas porções sem conteúdo espermático no lúmen), com interstício rico em tecido conjuntivo e vascularizado (Figura 26c,d). Em um espécime adulto, coletado em outubro, foi possível observar algumas células germinativas no lúmen juntamente com espermatozoides. Alguns espécimes coletados em março e dezembro apresentaram a porção basal do epidídimo com o lúmen repleto de espermatozoides, porém o mesmo não foi observado na porção apical. Similar ao ducto

epididimário, o ducto deferente estava revestido por epitélio pseudo-estratificado, com estereocílios e núcleos basal/central. A maioria dos espécimes coletados em dezembro não possuía espermatozoides no lúmen deste ducto. Por sua vez, os espécimes coletados em março e um espécime coletado em dezembro apresentaram o lúmen repleto de espermatozoides.

A análise histológica do rim indicou a ausência de separação evidente entre córtex e medula, caracterizando o denominado rim serial (Figura 27); entretanto, observou-se a divisão lobular deste órgão nos espécimes analisados. Os corpúsculos renais eram formados pelo glomérulo e o espaço de Bowman, sendo este caracterizado pelo epitélio pavimentoso simples e numerosos capilares sanguíneos (Figura 27a). Os túbulos contornados proximais (TCP) apresentaram-se com epitélio cúbico simples e células fortemente acidófilas, com microvilos em sua borda e lúmen mais estreito quando comparado aos demais túbulos renais (Figura 27c). Os túbulos contornados distais (TCD) estavam adjacentes aos túbulos contornados proximais (TCP) e se apresentaram em menores dimensões; porém, revestidos por um epitélio cúbico simples, menos acidófilas que o túbulo que o antecede (Figura 27c). Os túbulos coletores (TC) se apresentaram como os túbulos nefrônicos de maior diâmetro; com a parede revestida por epitélio cúbico simples, de células baixas, possivelmente ciliadas, e núcleo central; com as porções celulares medianas/apicais indicando a presença de secreção (Figura 27a,d).

O segmento sexual renal (SSR) foi observado em machos coletados nos meses de dezembro e março (Figura 27a,b); sendo nos espécimes coletados em março observada a maior quantidade secretória, indicando o pico de produção. A maioria dos espécimes de dezembro não apresentavam SSR, e os que apresentavam estavam em início de hipertrofia, assim como o observado nos espécimes de outubro; nos espécimes coletados em agosto e novembro o SSR estava ausente. Constatou-se o SSR em fêmeas adultas coletadas nos meses de março e novembro (Figura 27c,d), estando ausente nas coletadas em junho, setembro e outubro. Em algumas fêmeas adultas coletadas em dezembro foi observado o SSR, enquanto em outras estava ausente. O SSR se destaca por ser o túbulo com maior diâmetro no parênquima renal, sendo o mesmo revestido por epitélio cilíndrico, de células altas e núcleo basal; nas porções mediana/apical foi possível observar numerosos grânulos secretores que, de acordo com o aumento da atividade secretória, ocupavam toda a luz do lúmen. Foram observados em toda a extensão do rim, se concentrado em maior quantidade na porção caudal. Os SSRs em machos com grande porção secretória, apresentaram reação positiva leve a moderada ao PAS, corados ao tricrômio de Masson e não corados ao azul de alcian (Figura 28a,c,e). Os SSRs femininos não foram corados por nenhum dos corantes previamente utilizados (Figura 28b,d,f). Quanto à

porção hipertrofiada, há um forte indício de que seja a porção final do túbulo coletor e porção inicial do ureter.

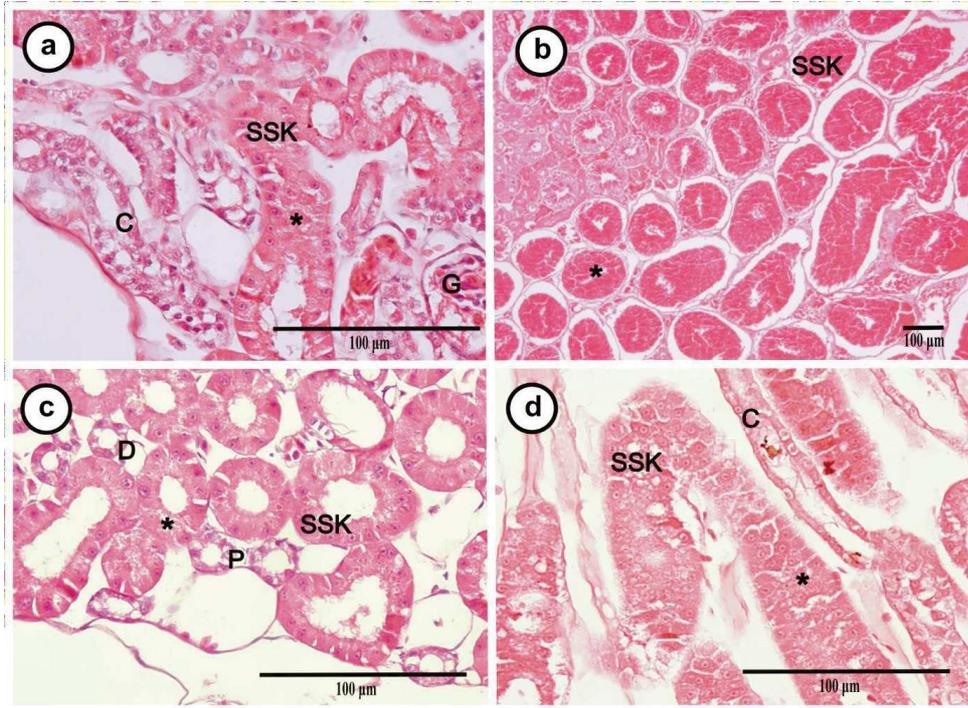


Figura 27: Microfotografias dos rins de espécimes machos (a,b) e fêmeas (c,d) de *Ophiodes* cf. *fragilis* coradas com hematoxilina e eosina. (a,c) Período inicial de hipertrofia e produção da secreção do segmento sexual renal; (c,d) período de pico de produção de secreção do segmento sexual renal. SSK – segmento sexual renal; G – glomérulo renal; C – túbulo coletor; D – túbulo contornado distal; P – túbulo contornado proximal; (*) – grânulos secretores do segmento sexual renal. Escala: (a,c,d) 400x; (b) 100x.

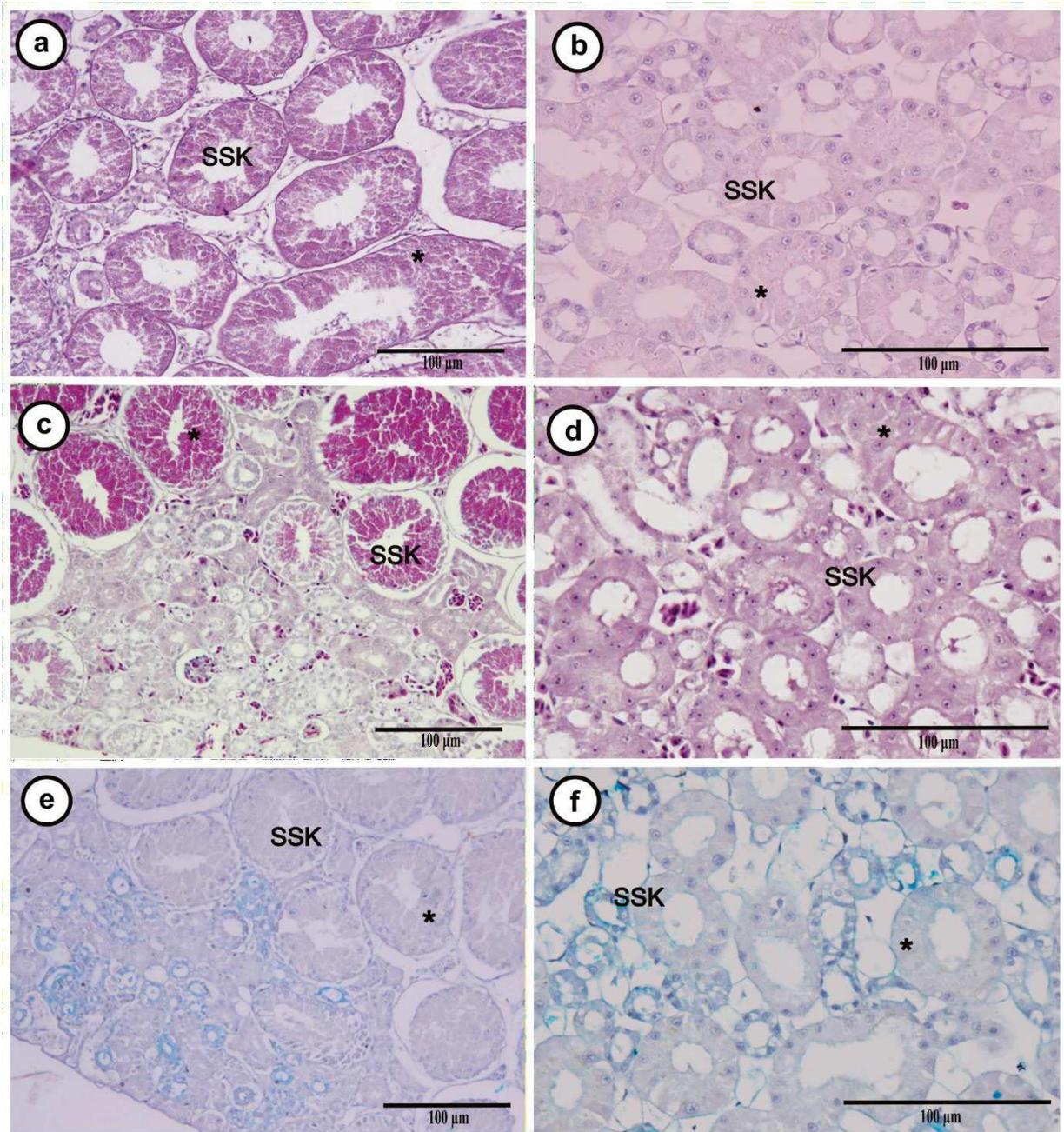


Figura 28: Microfotografias dos rins de espécimes machos (a,c,e) e fêmeas (b,d,f) de *Ophiodes* cf. *fragilis* coradas com ácido periódico de Schiff – PAS (a,b), tricrômio de Masson (c,d) e azul de Alcian (e,f). SSK – segmento sexual renal; (*) – grânulos secretores do segmento sexual renal. Escala: (a,c,e) 200x; (b,d,f) 400x.

4- DISCUSSÃO

O sistema urogenital de *Ophiodes* cf. *fragilis* apresentou características similares às anteriormente descritas para outros lagartos (órgãos do sistema urogenital em pares, com o lado direito superior ao do lado esquerdo). O que se destaca nesta espécie é a disposição dos órgãos

associada à sua morfologia; uma vez que *Ophiodes* possui o corpo alongado e afilado (PIZZATO, 2005) alguns de seus órgãos também se alongaram e se estreitaram de maneira a evitar o estresse das vísceras internas durante a locomoção por exemplo (CAMAITI et al., 2021). Dentre a morfologia externa comumente conhecida para a maioria dos lagartos, *Ophiodes* se diferencia por apresentar os rins mais semelhantes morfologicamente aos rins de serpentes e anfisbenas, sendo alongados e lobulares (VALVERDE et al., 2005; ROCHA-BARBOSA et al., 2015).

Tanto os espécimes machos quanto as fêmeas foram amostrados em maior quantidade no mês de dezembro. No sudeste do Brasil, o mês de dezembro é a transição entre as estações de primavera e verão, período chuvoso, com a maioria das espécies apresentando atividade reprodutiva (gametogênese, procura de parceiro, corte e cópula) por oferecer boas condições de desenvolvimento dos ovos e disponibilidade de alimento (SILVA e ARAÚJO, 2008), e com isso são mais frequentemente encontrados neste período. O sistema reprodutor em lagartos sofre variações ao longo das estações reprodutivas e não reprodutivas do ano (FLEMMING, 1994; GRIBBINS e GIST, 2003; FERREIRA e DOLDER, 2002; FERREIRA et al., 2002; RIBEIRO et al., 2012), uma vez que este também é controlado por hormônios (RHEUBERT et al., 2014) e estariam sujeitos a ação de diferentes fatores como temperatura, pluviosidade, padrões de fotoperíodo e disponibilidade de alimento (MARTÍNEZ-TORRES et al., 2003; FERREIRA et al., 2009; RAMÍREZ-BAUTISTA et al., 2019). Estudos realizados com diferentes espécies de *Ophiodes* sugerem que o ciclo reprodutivo das fêmeas seria anual (com atividade reprodutiva em um período específico do ano) enquanto para os machos seria contínuo (com armazenamento de esperma no ducto deferente até o acasalamento); desta forma, a gametogênese feminina e masculina aconteceria de forma assincrônica, mas o armazenamento de esperma permitiria a ordenação entre corte e cópula na primavera (PIZZATO, 2005; MONTECHIARO et al., 2011; ORTIZ et al., 2017). O ciclo reprodutivo de *Ophiodes cf. fragilis* não pode ser definido com certeza visto que não possuímos espécimes para análise coletados em todos os meses do ano. Entretanto, pelo padrão histológico observado, há indícios que o mesmo seja descontínuo e assincrônico; com a gametogênese ocorrendo em épocas diferentes do ano em machos e fêmeas e indivíduos de uma mesma localidade podendo apresentar fases diferentes da gametogênese (SILVA et al., 2016; BRAZ et al., 2019).

Greer (1967) descreveu as características do embrião de anguádeos vivíparos como “[...] grandes ovos ovídricos, cada um cercado por uma membrana fina e transparente [...]”. Tal membrana é secretada pelas glândulas da casca de ovo, também presentes em lagartos vivíparos (GUILLETTE, 1992). A viviparidade está associada a mudanças fisiológicas no trato

reprodutivo feminino como redução da densidade nas glândulas uterinas, aumento da vascularização uterina e redução da espessura da casca do ovo (GUILLETTE, 1992; BRAZ et al., 2018). *Ophiodes cf. fragilis* é vivíparo lecitotrófico (LEITÃO, 1973; ROCHA-BARBOSA et al., 1991; PIZZATO, 2005), apresentando assim um considerável número de glândulas da casca de ovo na região final do infundíbulo e em toda a região uterina do oviduto, sendo a estrutura do útero um padrão conservado em répteis Squamata (BRAZ et al., 2018).

O segmento sexual renal (SSR), considerado uma glândula acessória em Squamata (JOHNSON et al., 2014), foi caracterizado inicialmente apenas como uma estrutura observada em espécimes machos adultos, estando ausente em fêmeas e machos imaturos (NOVELLI et al., 2018). Entretanto, em nosso estudo o observamos em fêmeas adultas, com menor grau de hipertrofia quando comparado ao SSR de machos adultos. Tal característica também foi observada por Del Conte e Tamayo (1973) em fêmeas de *Cnemidophorus lemniscatus lemniscatus* (Linnaeus, 1758). Assim como observado em *Ophisops elegans* Ménétries, 1832 (NASSAR et al., 2017), *Bothrops cotiara* (Gomes, 1913) (BARROS et al., 2017) e *Apostolepis gaboi* Rodrigues, 1993 (BRAZ et al., 2019), a hipertrofia do SSR se mostrou associada a atividade reprodutiva de *Ophiodes cf. fragilis*. A atividade de ativação ou desativação da produção de secreção no SSR está intimamente relacionada a espermatogênese e presença de óvulos oviductais (SEVER e HOPKINS, 2005; RHEUBERT et al., 2011; MELO et al., 2019).

Apesar do crescente aumento de estudos de caracterização do SSR em Squamata, ainda pouco se sabe quanto às suas funções em machos (NOVELLI et al., 2018), entretanto pressupõe-se que o mesmo evoluiu de forma a melhorar o sucesso reprodutivo masculino, destacando-se as funções conhecidas de produção de feromônios e participação na produção de secreções da ampola e dos ductos deferentes; separação do sêmen da urina na cloaca; nutrição de espermatozoides; retenção do sêmen na cloaca da fêmea; além de promover um tamponamento da abertura genital da fêmea impedindo que copule com outros machos (pluguescopulatórios) (SEVER et al., 2002; SEVER e HOPKINS, 2005; RHEUBERT et al., 2015; BARROS et al., 2017; NOVELLI et al., 2018). Para fêmeas ainda não existem confirmações quanto à sua funcionalidade. Porém, especula-se que o SSR seja estimulado por baixo nível de andrógenos naturais (RHEUBERT et al., 2015) e esteja relacionado a manutenção de espermatozoides na espermateca, uma vez que a secreção do SSR é o principal componente do sêmen masculino (JOHNSON et al., 2014; MELO et al., 2019). A espermateca não foi encontrada nos ovidutos esquerdos das fêmeas analisadas de *Ophiodes cf. fragilis*. À vista disso, estudos futuros de análise dos ovidutos direitos e dos mecanismos fisiológicos e morfológicos

que estimulam a formação da espermateca são encorajados a fim de elucidar a funcionalidade da secreção do SSR em fêmeas de *Ophiodes*.

Observamos que os grânulos secretores do SSR de *Ophiodes cf. fragilis* foram corados por PAS e tricrômio de Masson, mas não por azul de alcian. As colorações de PAS e azul de alcian são utilizadas para identificação de glicoproteínas neutras e proteoglicanas em secreções celulares; e o tricrômio de Masson para coloração de melanócitos, tecido muscular e fibras colágenas (CAPUTO et al., 2010). As reações positiva e negativa da secreção do segmento sexual às colorações de PAS e azul de Alcian é altamente variável entre os estudos já realizados com diferentes espécies de Squamata (SEVER e HOPKINS, 2005; SEVER et al., 2012; RHEUBERT et al., 2011; NOVELLI et al., 2018; MELO et al., 2019). A coloração do SSR pelo tricrômio de Masson foi analisada pela primeira vez no presente estudo, e a coloração observada pode ser relacionada a maior atividade do epitélio de revestimento do SSR. A composição secretória do SSR ainda não foi completamente elucidada, assim a identificação de seus componentes é interessante de forma a auxiliar na compreensão de suas funções.

A atividade reprodutiva pode variar entre populações e entre sexo (SILVA e ARAÚJO, 2008). É de extrema importância o estudo da morfologia dos órgãos relacionados para estabelecer as principais características reprodutivas de uma espécie, como maturidade sexual, atividade reprodutiva e especializações morfológicas (GUALDRÓN-DURÁN et al., 2019). A grande diversidade de estratégias reprodutivas observadas em uma espécie pode estar relacionada a diferenças na oferta de recurso, o que pode resultar em variação reprodutiva populacional (SILVA e ARAÚJO, 2008). Este fato, associado às variações ambientais ocasionadas pela alteração do hábitat (como variação de temperatura, volume e frequência das chuvas) tornam estudos locais relevantes para a compreensão das particularidades reprodutivas de uma população, contribuindo assim para um maior conhecimento das condições as quais determinada espécie está exposta (SHINE e BONNET, 2009; BRAZ et al., 2019).

Poucos estudos reprodutivos são atribuídos a espécies de clima tropical, sendo as espécies de clima temperado mais estudadas (RHEUBERT et al., 2014; MELO et al., 2019). Este é o primeiro estudo que caracteriza a morfologia reprodutiva de uma espécie de *Ophiodes*, um gênero exclusivamente neotropical. Ao utilizarmos espécimes provenientes de Coleção Científica conseguimos obter uma amostragem que provavelmente não conseguiríamos ter acesso ao longo de um período curto de estudo devido a dificuldade de coletar espécimes *in vivo*. Ao gênero *Ophiodes* é atribuída ampla distribuição geográfica, ocupando diferentes habitats. As espécies que ocorrem no Brasil têm como principais territórios dois grandes biomas brasileiros (Cerrado e Mata Atlântica) e não possuem quase nenhuma informação quanto a

fatores biológicos e ecológicos, o que influencia diretamente em seu *status* de conservação. Diante disso, o presente estudo traz dados pioneiros de características reprodutivas e mecanismos relacionados à reprodução em *Ophiodes cf. fragilis*, uma espécie pertencente a um gênero com estudos inexistentes quanto a morfologia de órgãos associados à reprodução, contribuindo diretamente para seu conhecimento reprodutivo e conservação.

CAPÍTULO III*

Primeiro relato de hemiclitéris em fêmeas de lagartos do gênero *Ophiodes* Wagler, 1828 (Squamata: Anguidae)

*Aceito para publicação na seção Notas da revista Cuadernos de Herpetología.

1- INTRODUÇÃO

O primeiro estudo relacionado com hemipênis em lagartos foi realizado por Cope (1896), sendo descritas diferenças morfológicas encontradas nessa estrutura. Os hemiclitéris em fêmeas de Squamata foram registrados pela primeira vez por Böhme (1995) sendo considerada uma estrutura homóloga ao hemipênis. A morfologia dessas estruturas tem uma grande importância em estudos taxonômicos apresentando caracteres relevantes para o conhecimento de relações filogenéticas (ARNOLD, 1986a,b; VALDECANTOS e LOBO, 2015; QUIPILDOR et al., 2018).

O gênero *Ophiodes* (Anguidae) possui espécies de lagartos exclusivamente neotropicais, distribuídos no Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai (MACEY et al., 1999; UETZ et al., 2021). Atualmente é composto por seis espécies: *Ophiodes fragilis* (Raddi, 1820); *Ophiodes striatus* (Spix, 1825); *Ophiodes vertebralis* Bocourt, 1881; *Ophiodes intermedius* Boulenger, 1894; *Ophiodes luciae* Cacciali & Scott, 2015; e *Ophiodes enso* Entiauspe-Neto et al., 2017; e três morfotipos ainda não descritos formalmente: *Ophiodes* sp. “1”; *Ophiodes* sp. “2” e *Ophiodes* sp. “3” (BORGES-MARTINS, 1998; PIZZATO, 2005; MONTECHIARO et al., 2011; CACCIALI e SCOTT, 2012, 2015; COSTA e BÉRNILS, 2018; OLIVEIRA et al., 2016; ENTIAUSPE-NETO et al., 2017).

Ophiodes cf. *fragilis* (Raddi, 1820) é popularmente conhecido como cobra-de-vidro, está distribuído no Brasil nas regiões sudeste, centro-oeste, sul e nordeste do país (COSTA e BÉRNILS, 2018). Devido às semelhanças morfológicas e frequente ocorrência de simpatria, o gênero *Ophiodes* é um provável complexo de espécies (BORGES-MARTINS, 1998; BARROS e TEIXEIRA, 2007). No entanto, estudos de revisão taxonômica e filogenética deste grupo estão em falta, fazendo com que permaneçam com várias lacunas no conhecimento de características biológicas e ecológicas sendo necessários mais estudos dentro desse grupo de lagartos.

Estudos de morfologia reprodutiva em espécies do gênero *Ophiodes* são quase inexistentes. Este fato, relacionado aos impasses taxonômicos, tornam estudos que analisem estruturas utilizados na taxonomia de extrema importância. Neste contexto, nosso objetivo foi descrever morfologicamente o hemiclitéris e o hemipênis em espécimes de *Ophiodes cf. fragilis* do sudeste do Brasil.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Os hemiclitéris e hemipênis de quatro espécimes de *O. cf. fragilis* (dois machos e duas fêmeas) foram retirados durante a necropsia para estudo histológico. Os espécimes utilizados neste estudo pertencem a Coleção Herpetológica do Laboratório de Répteis da Universidade Federal de Juiz de Fora (CHUFJF-Répteis) sob os números de depósitos: 1108, 1644, 1646 e 1648. De acordo com os registros, os espécimes foram fixados em formaldeído 10%, por no mínimo 24 horas, e estavam acondicionados em álcool etílico 70 %.

Para os estudos do material em microscopia de luz, foram utilizadas as peças anatômicas bilaterais (direita e esquerda) integralmente (sem clivagem), sendo as mesmas desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e impregnadas/incluídas em parafina. Posteriormente, foram feitos cortes seriados de 4µm de espessura (TOLOSA et al., 2003). Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE). A análise das lâminas e fotodocumentação foi realizada em microscópio Olympus BX41 com equipamento fotográfico digital Canon A3100S e ocular micrométrica acoplada.

3- RESULTADOS

Os hemiclitéris observados em *O. cf. fragilis* se mostraram com estruturas unilobulares, projetando-se lateralmente na abertura cloacal (Figura 29a,b,c,d). Os sulcus spermaticus foram identificados na posição centro-lateral dos espécimes analisados. A ornamentação foi semelhante nas porções apical e tronco/basal apresentando o mesmo formato (Figura 29b,c): estruturas pontiagudas delicadas, com os ápices arredondados, que seguiram ao longo de todo o hemiclitéris, arranjados em diversas camadas.

Os hemipênis eram pareados e bifurcados, cada uma dessas estruturas também se projetava lateralmente a abertura cloacal (Figura 29e,f,g,h). Cada hemipênis apresentou o tronco largo, com o sulcus spermaticus centro-lineal evidente no lado dorsal (porção sulcada). A ornamentação foi variada no ápice, no tronco e na base (Figura 29f): na porção apical dos lobos observou-se a presença de linhas verticais circundantes; na porção do tronco até próxima

a porção basal constatou-se a existência de pequenas estruturas pontiagudas que seguiam ao longo do hemipênis, em diversas camadas, até a porção basal; e na porção mais basal verificou-se a inexistência de qualquer ornamentação evidente, sendo uma estrutura tecidual lisa.

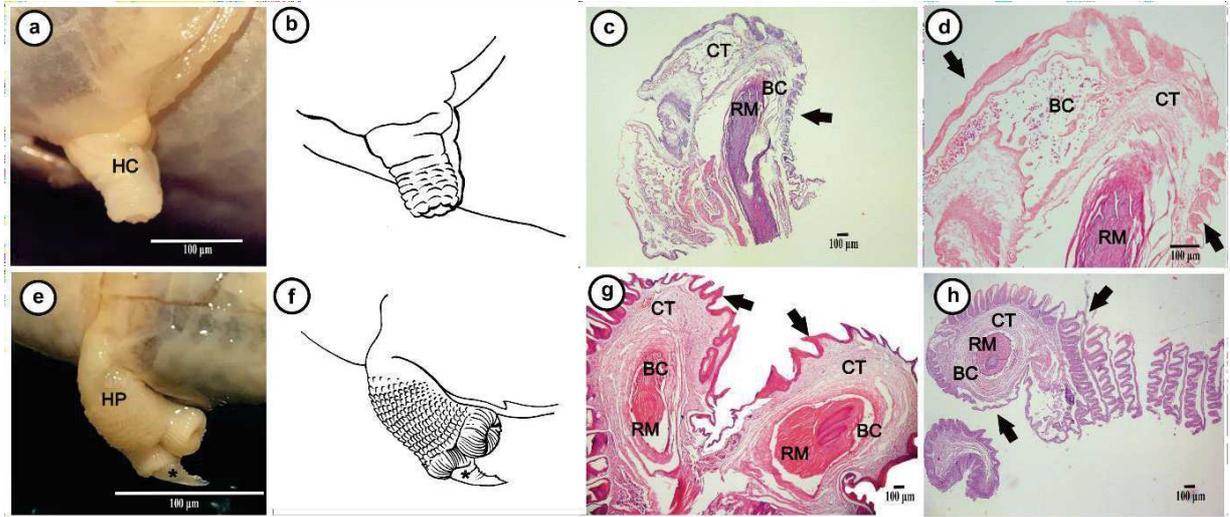


Figura 29: Hemiclitoris (a,b,c,d) e hemipênis (e,f,g,h) de *Ophiodes cf. fragilis*. (a,e) Fotografia do hemiclitoris e hemipênis. (b,f) Figura esquemática do hemiclitoris e hemipênis. (c,d,g,h) Microfotografias do hemiclitoris e hemipênis. HP: hemipênis; HC: hemiclitoris; (*): artefato tecidual de eversão do hemipênis; CT: tecido conjuntivo; RM: músculo retractor do hemipênis e do hemiclitoris; BC: células sanguíneas; Seta: ornamentação do hemipênis e hemiclitoris.

A análise histológica revelou o revestimento externo do hemipênis constituído por uma delgada camada de tecido epitelial pavimentoso ceratinizado. Subjacente ao revestimento observou-se uma espessa camada de tecido conjuntivo frouxo superficialmente bem vascularizada. Na região mediana central de cada lobo, observou-se uma camada de tecido muscular liso e o músculo retractor magnus do hemipênis (Figura 29g,h). A análise histológica do hemiclitoris apresentou características similares as observadas para o hemipênis (Figura 29c,d). Contudo, a camada epitelial superficial ceratinizada do hemiclitoris mostrou-se mais delicada quando comparada a do hemipênis.

4- DISCUSSÃO

As características hemipeniais do gênero *Ophiodes* já foram anteriormente estudadas. Borges-Martins (1998) (não publicado) analisou e descreveu o hemipênis com traços comuns às espécies do gênero *Ophiodes*. Nunes et al. (2014) descreveram a morfologia do hemipênis de *Ophiodes fragilis*, destacando a ausência de estruturas ósseas e espinhosas nos espécimes

analisados. Ambos autores descreveram características complementares e similares às observadas nos espécimes que analisamos. Apesar da ausência de estudos que destacam o hemiclitoris em *Ophiodes*, Borges-Martins (1998) destacou em seu trabalho a possibilidade de eversão de uma estrutura com características similares ao hemipênis, sem ornamentações, em espécimes fêmeas analisadas do gênero.

Assim como o hemipênis, o hemiclitoris é considerada uma sinapomorfia dos Répteis Squamata (AX, 2003; VALDECANTOS e LOBO, 2015). Estas estruturas podem apresentar características únicas do gênero ou espécie (CARD e KLUGE, 1995; KOCH et al., 2010; KLACZKO et al., 2017); além da variação morfológica em ornamentação, tamanho e forma entre os sexos (VALDECANTOS e LOBO, 2015; QUIPILDOR et al., 2018). Entre os Squamata, o estudo de características morfológicas do hemipênis estão mais presentes no grupo das serpentes (ARNOLD, 1986a), revelando que o mesmo seja mais complexo e diverso quando comparado ao de lagartos (KLACZKO et al., 2017). Com isso, o uso do hemipênis/hemiclitoris como caráter taxonômico em lagartos deve ser utilizado com cautela uma vez que podem variar de morfologia (ex.: ornamentação e número de lóbulos) entre os sexos, como observado neste estudo, ou serem conservados morfológicamente em diversas linhagens (GREDLER et al., 2014).

Os estudos com hemipênis e hemiclitoris descrevem, principalmente, a variação da morfologia externa (ver KASPEROVICZUS et al., 2011; VALDECANTOS e LOBO, 2015) e caracterização macroscópica dessas estruturas (QUIPILDOR et al., 2018). Desse modo, informações sobre a composição e organização tecidual são praticamente inexistentes. Em nosso estudo, exploramos a análise histológica como uma forma de descrever a organização morfológica tecidual interna do hemiclitoris e hemipênis de *O. cf. fragilis*, destacando a abundante porção de tecido conjuntivo, a musculatura lisa que forma o músculo retrator em ambas estruturas e a presença de células sanguíneas no espaço que, ao ser preenchido com sangue, promove a eversão do hemipênis e, possivelmente, também do hemiclitoris.

Descrevemos a estrutura morfológica externa do hemiclitoris e destacamos características histológicas do hemipênis e hemiclitoris de *Ophiodes cf. fragilis* pela primeira vez na literatura. Observamos que a morfologia externa (composta por ornamentações, tamanho, número de lóbulos-forma) variou entre os sexos; contudo, a morfologia interna (representada pela análise tecidual e presença de músculo retrator) era similar entre as estruturas analisadas. Ressaltamos a necessidade estudos complementares sobre as características morfológicas do hemipênis/hemiclitoris de espécies de *Ophiodes* como forma adicional para elucidação taxonômica do gênero.

CAPÍTULO IV

Caracterização citogenética e padrão do DNA repetitivo em *Ophiodes* cf. *fragilis* (Raddi, 1820) (Squamata: Anguidae) do sudeste do Brasil

1- INTRODUÇÃO

Os estudos de citogenética com Répteis se concentravam, inicialmente, em definições de cariótipos das espécies. Com o passar dos anos, os estudos cariotípicos foram diminuindo em número, mas começaram a se destacar pelas novas análises e metodologias aplicadas (PECCININI-SEALE, 1981). Os estudos de cariótipo têm inúmeras aplicabilidades como na sistemática, taxonomia e evolução (PAULL et al., 1976; PECCININI-SEALE, 1981; MACEY et al., 1999; CASTIGLIA et al., 2010), definição de sistemas de determinação sexual (CHEVALIER et al., 1979; EZAZ et al. 2009; TELEMECO, 2015; NIELSEN et al., 2018) e variabilidade específica e populacional (BEZY et al., 1977; HALL, 2009; MEZZASALMA et al., 2013; CASTIGLIA et al., 2013). Os cariótipos deste grupo são compostos tanto por macrocromossomos e microcromossomos como por cromossomos de tamanhos distintos (podendo ou não existir redução de tamanho), sendo semelhantes em estrutura e comportamento durante a divisão celular; e variando em número e formato de acordo com o grupo taxonômico (espécie, gênero e até família) (WEBSTER et al., 1972; CAPUTO et al., 1994; ORGAN et al., 2008; GIOVANNOTTI et al., 2009).

Globalmente são conhecidas quase 7.000 espécies (UETZ et al., 2021) de lagartos, destas pouco mais de 270 ocorrem no Brasil pertencentes as mais diferentes famílias (COSTA e BÉRNILS, 2018), dentre elas a família Anguidae. Anguidae possui representantes em diversos continentes, ocupando diferentes habitats e apresentando distintas adaptações relacionadas a eles (MACEY et al., 1999; PYRON et al., 2013; ENTIAUSPE-NETO et al., 2017; UETZ et al., 2021). Apesar de sua ampla distribuição geográfica e variedade biológica (como por exemplo espécies com/sem membros, ovíparas e vivíparas) poucos estudos citogenéticos podem ser encontrados com espécies desta família, principalmente espécies tropicais, se destacando estudos com espécies da Europa e América do Norte (BURY et al., 1969; BEZY et al., 1977; MACEY et al., 1999; CASTIGLIA et al., 2010; MEZZASALMA et al., 2013; TELEMECO, 2015).

Entre os anguídeos que ocorrem a América do Sul se destacam os lagartos endêmicos do gênero *Ophiodes* (MACEY et al., 1999). Das sete espécies conhecidas, quatro podem ser

encontradas no Brasil – *Ophiodes fragilis* (Raddi, 1820); *Ophiodes yacupoi* Gallardo, 1966; *Ophiodes striatus* (Spix, 1825) e *Ophiodes enso* Entiauspe-Neto et al., 2017 – além de três espécies candidatas – *Ophiodes* sp. “1”; *Ophiodes* sp. “2” e *Ophiodes* sp. “3” – ainda não formalmente descritas (BORGES-MARTINS, 1998; CACCIALI e SCOTT, 2012, 2015; ENTIAUSPE-NETO et al., 2017). Embora apresente ampla distribuição geográfica (BORGES-MARTINS, 1998) e poucas espécies, o cariótipo foi estudado apenas em duas espécies por Beçak et al. (1972), Hernando (2002) e Hernando e Alvarez (2005). Ambas apresentaram cariótipo $2n = 36$ (12 macrocromossomos e 24 microcromossomos), com os pares de macrocromossomos 1, 3, 4 e 5 metacêntricos e os pares 2 e 6 submetacêntricos e com heteromorfismo do cromossomo sexual ausente (BEÇAK et al., 1972; HERNANDO, 2002; HERNANDO e ALVAREZ, 2005).

Considerando as semelhanças morfológicas e frequente ocorrência de simpatia em espécies do gênero *Ophiodes* (BORGES-MARTINS, 1998; CACCIALI e SCOTT, 2015), somada a aplicabilidade de estudos de descrição e caracterização cariotípica para distinção de espécies observado a carência de estudos citogenéticos com as espécies de anguídeos neotropicais, nossos objetivos foram: (1) caracterizar o cariótipo de *Ophiodes* cf. *fragilis* utilizando técnicas de citogenética tradicionais e molecular, (2) analisar comparativamente os cariótipos já descrito para espécies congêneres e de outras espécies de Anguillidae e (3) propor o possível número cromossômico ancestral em Anguillidae.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Espécimes analisados

Foram analisados dois espécimes machos adultos de *Ophiodes* cf. *fragilis* coletados no município de Juiz de Fora no ano de 2018. Os espécimes aqui analisados apresentaram características morfológicas e distribuição geográfica atribuídas a espécie candidata *Ophiodes* sp. 2 (BORGES-MARTINS, 1998). Entretanto, por esta não estar formalmente descrita até a presente data e os espécimes possuírem características morfológicas mais próxima a *Ophiodes fragilis* (dentre as espécies formalmente descritas), optamos por denomina-los como *Ophiodes* cf. *fragilis*. A coleta e manipulação seguiram as determinações válidas nas autorizações do SISBIO nº 59680/3 e no Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora protocolo 040/2017. Os espécimes coletados no município de Juiz de Fora também foram registrados no Centro de Triagem de Animais Silvestres de Juiz de Fora (CETAS – JF) com os termos de responsabilidade de número 014/18 UT-JF e 035/18 UT-JF. Os mesmos foram

eutanasiados, fixados e depositados na Coleção de Herpetológica do Laboratório de Répteis da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) (números de depósitos: 2115 e 2116). Suspensões celulares foram preparadas e depositadas no Laboratório de Sistemática Molecular (Beagle) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) sob os números de depósito 5999 e 6000. Porções do coração e fígado foram retiradas para Coleção de Material Genético e foram depositadas na Coleção de Tecidos do Laboratório de Répteis da UFJF e do Laboratório de Sistemática Molecular (Beagle) da UFV.

2.2- Preparação da suspensão celular

A preparação cromossômica para análise foi obtida a partir de suspensão celular do estômago/intestino, utilizando o protocolo adaptado de Schmid (1978). Os espécimes foram alimentados 24 horas antes da eutanásia para estimulação de atividade celular nos órgãos anteriormente referidos. Para obtenção de células em metáfase, 8 horas antes da eutanásia foi injetada intraperitonealmente solução de colchicina a 0,1%, na proporção aproximada de 0,1 ml/10 g de peso do animal. Após este período, os espécimes foram eutanasiados através da injeção intraperitoneal de 0,01 ml/mg de Hypnol a fim de induzir a anestesia e 60 mg/kg de pentobarbital (dose letal) conforme autorizado pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), Conselho Federal de Biologia (CFBio) e o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Durante a necropsia, a porção final do estômago e inicial do intestino delgado foram separadas e adicionado citrato de sódio 0,9%, seguida pela raspagem para obtenção da suspensão celular. A suspensão celular obtida foi fixada em metanol : ácido acético (3:1) para posterior preparação das lâminas.

2.3- Análises citogenéticas tradicionais

As lâminas foram preparadas pela técnica de *spash* e coradas com Giemsa 5% diluído em um tampão de fosfato de sódio (pH 6.8), para identificação dos cromossomos metafásicos. As regiões organizadoras de nucléolo (NOR) foram evidenciadas pela técnica de impregnação de prata adaptada de Howell e Black (1980). Para a detecção de heterocromatina foi utilizada a técnica de bandeamento C proposta por Sumner (1972), com adaptações. As metáfases foram fotografadas com auxílio do fotomicroscópio Olympus BX53 e no Software CellSens Dimensions. Os cromossomos homólogos foram pareados utilizando o software Photoshop CC, medidos com auxílio do Software Image Pro Plus®, classificados seguindo Green e Sessions

(1991) em metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e telocêntricos e organizados em ordem decrescente de tamanho.

2.4- *Análise citogenética molecular*

As sondas de oligonucleotídeos com sequências repetitivas CA₍₁₅₎, GA₍₁₅₎, GAG₍₁₀₎ e TTAGGG₍₆₎ foram marcadas diretamente com Cy3 (Sigma (St. Louis, MO, USA)). O mapeamento cromossômico foi realizado pela técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) segundo Pinkel et al. (1986), com as seguintes modificações: os cromossomos metafásicos foram desidratados em série alcoólica (70%, 90% e 100%) por 5 min em cada concentração; aquecidos por 1 h a 75 °C e acondicionados por 3 min em solução pepsina (500µl) + RNase (100 µl) + ácido clorídrico (HCl). Depois de descartada a solução anterior, os cromossomos metafásicos foram lavados com PBS 1x por 5 min; posteriormente foi adicionado 100 µl de paraformaldeído 1% nas lâminas e as mesmas foram cobertas com lamínulas por 10 min. Após este período, as lamínulas foram descartadas e lavadas com PBS 1x por 5 min em shaker; em seguida, as lâminas foram desidratadas em nova série alcoólica (70%, 90% e 100%) por 2 min em cada concentração e colocadas para secagem ao ar. Quando constatado que as mesmas estavam secas, foi adicionado 100 µl de formamida 70%, cobertas com lamínulas e mantidas em placa aquecedora a 75 °C por 3 min; novamente desidratadas em série alcoólica (70% - gelado -, 90% e 100%) por 2 min em cada concentração, colocadas para secagem ao ar, posteriormente, adicionado 30 µl de Hybmix + sonda em cada lâmina, cobertas com lamínula (as quais foram mantidas em câmara úmida, a 37 °C, overnight). No dia seguinte, as lamínulas foram retiradas e lavadas em 100 ml de 1xSSC (por 1 h, em banho maria a 65 °C), 4xSC Tween (por 5 min, em shaker), PBS 1x (agitada a mão); desidratadas em série alcoólica (70%, 90% e 100%) e mantidas até a secagem completa ao ar. Ao final, os cromossomos foram contrastados com DAPI (DAPI Fluorshield, Sigma Aldrich) e acondicionadas em caixa escura resfriada até a análise. Em todas as análises, foram utilizadas no mínimo 10 metáfases por espécime. As imagens das metáfases foram obtidas em microscópio Olympus BX53, com câmera DP73F Olympus, utilizando-se o software CellSens Imaging.

2.5- *Reconstrução do número cromossômico ancestral:*

A reconstrução do número cromossômico ancestral foi feita no Software Mesquite versão 3.61. Utilizamos como base para nossa reconstrução a proposta filogenética para répteis Squamata de Pyron (2017). Nesta proposta, Anguidae é representada por espécies das três

subfamílias (Diploglossinae, Gherrhonotinae e Anguinae). Optamos por utilizar os dados de Anniellidae como grupo externo e irmão de Anguidae. As espécies e seus respectivos números cromossômicos são descritos na Tabela 1. A reconstrução foi feita através de uma Análise de Parcimônia. Os números cromossômicos foram classificados em cinco grupos: $2n = 22$ (grupo 1), $2n = 36$ (grupo 2), $2n = 38$ (grupo 3), $2n = 48$ (grupo 4) e $2n = 44$ (grupo 5).

3- RESULTADOS

Os espécimes analisados de *Ophiodes cf. fragilis* apresentaram o número diploide de 36 ($2n = 36$) sendo 12 macrocromossomos e 24 microcromossomos. Entre os macrocromossomos os pares 1, 3, 4 e 5 eram metacêntricos e os pares 2 e 6 submetacêntricos (Figura 30A). Nos microcromossomos não foi possível identificar com exatidão a morfologia. O número fundamental (NF) foi de 48. O heteromorfismo do cromossomo sexual evidente está ausente nos machos analisados. Ambos os espécimes sinalizaram positivamente para heterocromatina na região pericentrométrica de todos os macrocromossomos e nos microcromossomos (Figura 30B). A região organizadora de nucléolo (NOR) foi sinalizada na região terminal do braço longo do par de cromossomo 1 em ambos espécimes (Figura 30C), com a maioria das metáfases analisadas apresentando apenas um dos cromossomos do par com NOR ativa. Entre as sondas de DNA repetitivo analisadas, foi observado sinal evidente na $GAG_{(10)}$, marcando na região terminal dos macrocromossomos e em todos os microcromossomos (Figura 30D).

A reconstrução do número cromossômico ancestral, pela análise de Parcimônia, indicou que o $2n = 36$ seria o mais ancestral em Anguidae e Anniellidae, com os demais números cromossômicos sendo derivados deste (Figura 31). Nossa análise sugere que o $2n = 36$ estaria presente em espécies das três subfamílias de Anguidae. Sendo este um provável número cromossômico padrão para Diploglossinae.

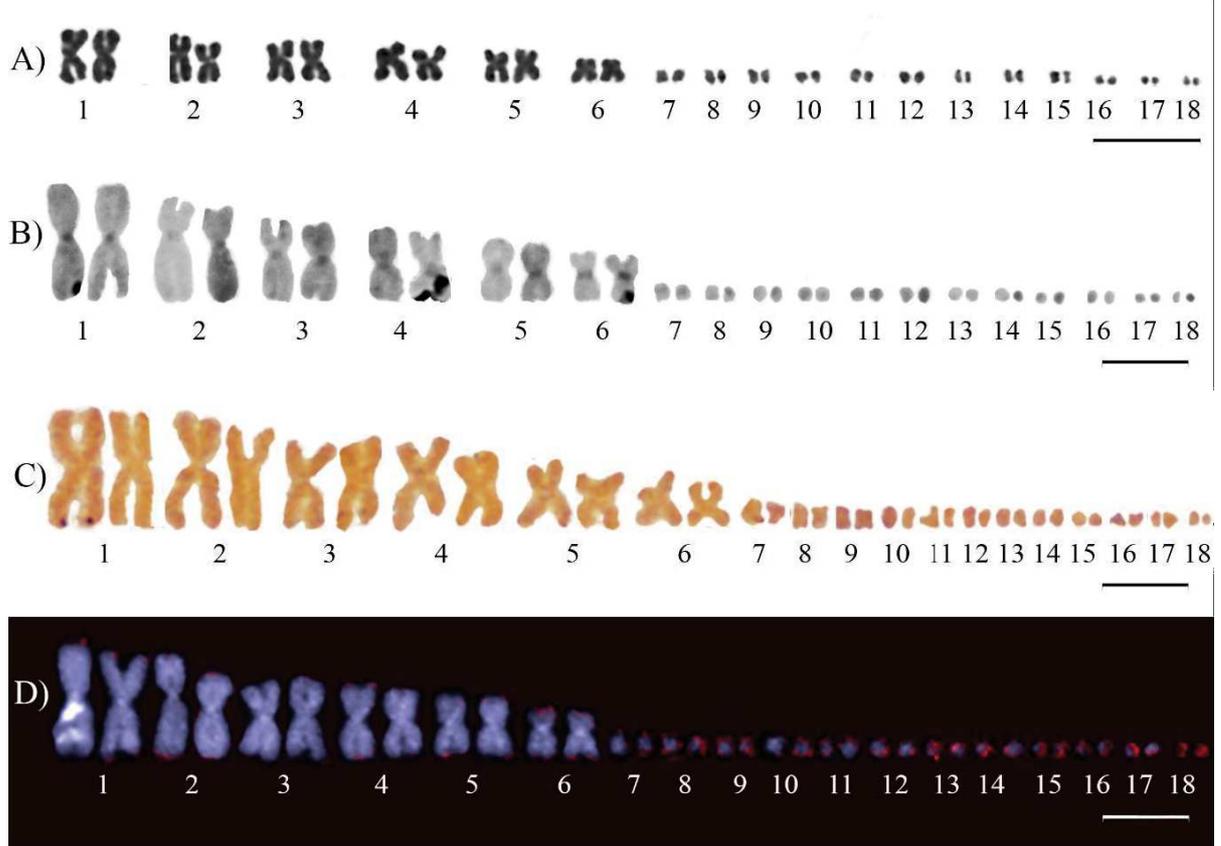


Figura 30: Cariótipo dos espécimes de *Ophiodes* cf. *fragilis* analisados. (A) Giemsa; (B) Bandeamento-C; (C) Região organizadora de nucléolo ativa no cromossomo 1 do par 1; e (D) Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), sequência de nucleotídeo GAG₍₁₀₎. A barra corresponde em (A) a 10 μ m e em (B, C e D) a 5 μ m.

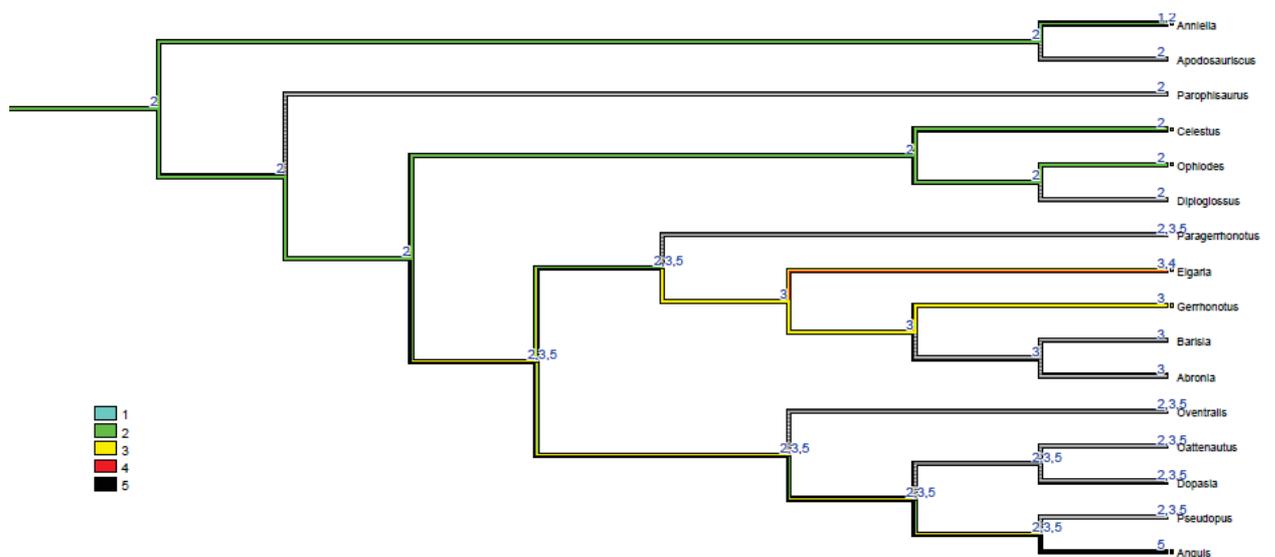


Figura 31: Reconstrução do número cromossômico ($2n$) ancestral por Parcimônia de Anguillidae, baseada na proposta filogenética de Pyron (2017). Legenda: Azul – grupo 1, $2n =$

22; Verde – grupo 2, $2n = 36$; Amarelo – grupo 3, $2n = 38$; Vermelho – grupo 4, $2n = 48$; Preto – grupo 5, $2n = 44$.

4- DISCUSSÃO

Ophiodes cf. fragilis foi a terceira espécie estudada, do ponto de vista citogenético, do gênero *Ophiodes*. Nossos dados corroboram os padrões obtidos em estudos anteriores para *O. striatus* e *O. intermedius* (BEÇAK et al., 1972; HERNANDO, 2002; HERNANDO e ALVAREZ, 2005). As duas espécies analisadas apresentaram $2n = 36$, com o cariótipo constituído por 12 macrocromossomos (Mc) e 24 microcromossomos (mc), sendo a morfologia dos macrocromossomos metacêntrica e submetacêntrica (Tabela 1). Este fato evidencia a possibilidade de o cariótipo descrito acima ser estável e comum para as espécies do gênero, podendo ser um dos elementos que influenciaram a similaridade morfológica externa (CÓLUS e FERRARI, 1988) observada entre as espécies de *Ophiodes*.

Conhecer os sítios de marcação da região organizadora de nucléolo (NOR) e da heterocromatina constitutiva são importantes para caracterização de espécies e a compreensão da evolução cariotípica em grupos específicos (LOPES et al., 2020; SILVA et al., 2020). A marcação da NOR e a distribuição de heterocromatina constitutiva foram analisados por Mezzalma et al. (2013) em *Anguis veronensis* Pollini, 1818, sendo observada a NOR em três pares de microcromossomos e a heterocromatina distribuída nas regiões pericêntricas de todos os macrocromossomos e nos mesmos três pares de microcromossomos da NOR; no entanto, os autores não especificaram quais seriam esses pares. Para *Ophiodes cf. fragilis* foi observada a marcação de NOR no primeiro par de macrocromossomos, com a predominância de apenas um dos cromossomos do par com NOR ativa, e a distribuição de heterocromatina em todos os macros e microcromossomos. Entretanto, este é o primeiro estudo para *Ophiodes* que utiliza as técnicas de localização da NOR e da heterocromatina, sendo são raros estudos com as referidas técnicas também para Anguidae (Tabela 1); por conseguinte, dificulta análises de evolução cromossômica comparada no grupo (GUERRA e SOUZA, 2002).

Estudos de caracterização do cariótipo em lagartos são escassos, principalmente utilizando técnicas citogenéticas moleculares. Este é o primeiro estudo que combina informações de citogenética clássica e citogenética molecular para uma espécie de Anguidae. Técnicas de hibridização fluorescente in situ (FISH) se mostram eficientes para diversas finalidades como análise de danos nos cromossomos, mapeamento genético, genômica comparativa e biologia evolutiva (NEVES e GUEDES, 2012). Para lagartos, o FISH tem sido

empregado atualmente na marcação de sequências de nucleotídeos específicos (ver SIDHOM et al., 2020; SILVA et al., 2020), como o presente estudo. Das sondas analisadas, apenas em GAG(10) foi observado com clareza o sítio de marcação (região terminal) em todos os cromossomos. Estas análises podem ser utilizadas como parâmetros para estudos de cariótipo de outras espécies de *Ophiodes*, além de servir como base para estudos comparativos com outras espécies de Diploglossinae e Anguidae.

O número diploide $2n = 36$ foi observado por Bury et al. (1969) ao estudar os cromossomos de *Celestus costatus* (= *Diploglossus costatus*) (Cope, 1962), sendo esta espécie pertencente a mesma subfamília de *Ophiodes* (Diploglossinae). Como nas espécies de *Ophiodes*, *C. costatus* apresentou cariótipo composto por 12 Mc e 24 mc, se distinguindo pela morfologia predominantemente metacêntrica dos macrocromossomos (BURY et al., 1969) (Tabela 1). Em Squamata, $2n = 36$ é apontado como o número cromossômico diploide ancestral, ocorrendo em diferentes famílias de lagartos como Iguanidae, Chamaeleontidae, Phrynosomatidae, Lacertidae, Agamidae e Teiidae, além de Anguidae (CHEVALIER et al., 1979; CAPULA et al., 1989; HALL, 2009; SILVA et al., 2020). Nossa reconstrução utilizando o número diploide de espécies de Anguidae sugere que o $2n = 36$ seja o número cromossômico ancestral da família, e padrão para Diploglossinae, sendo os demais números diploides irradiados deste (Figura 31). A constituição de 12 Mc e 24 mc é considerada o cariótipo padrão e estável, podendo ser encontrada em diferentes famílias de lagartos, estando estas filogeneticamente relacionadas ou não (PAULL et al., 1976).

O cariótipo de Anguidae apresenta grande variabilidade ($2n = 30-48$) (POKORNÁ et al., 2012), como pode ser observado na Tabela 1. Anniellidae foi anteriormente considerada uma subfamília de Anguidae (MARCEY et al., 1999; UETZ et al., 2021); entretanto, optamos por adotar a classificação proposta por Pyron et al. (2013) e Pyron (2017) as quais elevam Anniellidae a classificação taxonômica de família, sendo esta próxima filogeneticamente a Anguidae, tornando as informações cariotípicas relevantes para entendimento do grupo. Os cariótipos de Anguidae e Anniellidae são constituídos por macro e microcromossomos e apresentam como possível número cromossômico ancestral o $2n = 36$. O número de microcromossomos em Anguidae é alto, variando de 24 a 26, sendo a exceção observada em *Mesaspis monticola* (= *Gerrhonotus monticolus*) (Cope, 1878) com 10 mc (BURY et al., 1969). Diploglossinae e *Elgaria coeruleus* (= *Gerrhonotus coeruleus*) (Wiegmann, 1828) apresentam o menor número de macrocromossomos (12 Mc) (BURY et al., 1969; BEÇAK et al., 1972; HERNANDO e ALVAREZ, 2005). O número de macrocromossomos de Anniellidae é similar ao encontrado nas espécies estudadas de Anguinae e algumas espécies de Gerrhonotinae; por

outro lado, possui menos microcromossomos do que a maioria das espécies de Anguidae, com uma das espécies estudadas exibindo um número bastante reduzido (4 e 6 mc, *Anniella pulchra* Gray, 1852) (BEZZY et al., 1977) (Tabela 1). Um cariótipo com poucos microcromossomos é considerado mais derivado quando comparado a um cariótipo com muitos (CHEVALIER et al., 1979); desta forma, o cariótipo de Anniellidae poderia ser interpretado como mais derivado relativo ao de Anguidae. Por outro lado, um cariótipo com muitos cromossomos acrocêntricos seria plesiomórfico a um cariótipo com muitos metacêntricos (CHEVALIER et al., 1979); deste modo, o cariótipo de Diploglossinae seria mais recente quando comparado a Gerrhonotinae, por exemplo. Entretanto, estudos moleculares e de datação de origem das espécies, em ambas as famílias, estão em falta sendo um dos fatores resultantes da inexistência de informações quanto a origem e diversificação cariotípica e suas relações em Anguidae e Anniellidae.

Existem poucos estudos cariotípicos com as espécies de Anguidae (Tabela 1); e, se restrito para Diploglossinae e neotropicais, esses dados se tornam ainda mais deficientes (BURY et al., 1969). Este trabalho apresenta pela primeira vez a caracterização cariotípica de uma espécie do gênero *Ophiodes* com o uso de técnicas de citogenética clássica e molecular. O cariótipo de *Ophiodes* cf. *fragilis* observado é similar ao anteriormente descrito para outras espécies do gênero; contudo, a escassez de estudos com técnicas de análises de cromossomos clássicas e moleculares, impossibilitam discussões em níveis taxonômicos. Nossos dados sugerem que o número cromossômico ancestral em Anguidae e Anniellidae seja $2n = 36$, assim como pressuposto para Squamata. Embora Anguidae seja caracterizada como uma família com heteromorfia dos cromossomos sexuais ausentes (EZAZ et al., 2009), ressalta-se a necessidade de análise de espécimes fêmeas para a confirmação desse padrão em *Ophiodes*. O sistema sexual nesta espécie ainda não foi determinado. Entretanto, técnicas recentes como o uso de sequências de DNA restritas associadas a sítios (*restriction site-associated DNA sequencing* – RADseq) que utilizam marcadores RAD específicos para o sexo masculino ou feminino (NIELSEN et al., 2018) mostram-se viáveis para a determinação do sistema sexual em espécies sem heteromorfismo dos cromossomos sexuais. Estudos complementares com uso de diferentes marcadores, com espécimes de outras regiões e com outras espécies de *Ophiodes*, além de estudos cariotípicos com espécies de outros gêneros de Anguidae, são promissores para elucidação de possíveis diferenciações cariotípica no gênero e evolução cariotípica no grupo.

Tabela 1: Estudos citogenéticos com espécies de Anguidae e Anniellidae disponíveis na literatura.

| Espécie | 2n* | NF | Morfologia** | Sexo | SS | NOR | Bandeamento-C | Referência |
|------------------------------|-----------------------|-----------|-----------------------------|-------------|-----------|---------------|--|--------------------------|
| Anguidae | | | | | | | | |
| <u>Anguinae</u> | | | | | | | | |
| <i>Anguis veronensis</i> | 44 (20 Mc e 24 mc) | - | 1 m; 4 e 5 sbm; 2, 3, 6-9 a | M/F | Ausente | 3 pares de mc | Pericentromérica de todos os Mc e 3 pares de mc (mesmos NOR) | MEZZASALMA et al. (2013) |
| <i>Anguis fragilis</i> | 44 (20 Mc e 24 mc) | - | 1, 4 e 5 m; 2, 3 e 6-10 a | - | - | | | |
| <u>Gerrhonotinae</u> | | | | | | | | |
| <i>Elgaria multicarinata</i> | 48 (22 Mc e 26 mc) | 48 | 1-11 a | - | - | - | - | |
| <i>Elgaria paucicarinata</i> | 46 (20 Mc e 26 mc) | 46 | 1 m; 2-10 a | - | - | - | - | BURY et al. (1969) |
| <i>Elgaria coerulea</i> | 38 (12 Mc e 26 mc) | 48 | 1-5 m; 6 a | - | - | - | - | |
| <i>Mesaspis monticola</i> | 30 (20 Mc e 10 mc) | 34 | 1, 2 e 10 m; 3-9 a/sba | - | - | - | - | |
| <i>Gerrhonotus</i> | 38 | | | M | - | - | - | CASTIGLIA et al. (2010) |
| <i>cf. liocephalus</i> | (14 Mc e 24 mc) | - | - | | | | | |
| <u>Diploglossinae</u> | | | | | | | | |
| <i>Celestus costatus</i> | 36 (12 Mc e 24 mc) | 48 | 1-6 m | - | - | - | - | BURY et al. (1969) |

| | | | | | | | | |
|------------------------------|-----------------------|----|---|-----|---|-------|---|---------------------------------|
| <i>Ophiodes striatus</i> | 36 (12 Mc e 24 mc) | - | 1; 3; 4 e 5 m; 2 e 6 sbm | M/F | - | - | - | BEÇAK et al. (1972) |
| <i>Ophiodes intermedius</i> | 36 (12 Mc e 24 mc) | - | 1; 3; 4 e 5 m; 2 e 6 sbm | M/F | - | - | - | HERNANDO e ALVAREZ (2005) |
| <i>Ophiodes cf. fragilis</i> | 36 (12 Mc e 24 mc) | 48 | 1; 3; 4 e 5 m; 2 e 6 sbm | M | - | Par 1 | Pericentromérica de todos os Mc e mc | Presente Estudo |
| Anniellidae | | | | | | | | |
| <i>Anniella geronimensis</i> | 36 (20 Mc e 16 mc) | - | 1, 2 e 6 m/sbm; 3-5 e 7-10 a/sba | M/F | - | - | - | |
| <i>Anniella pulchra</i> | 22 (16 Mc e 6 mc) | - | 1; 3 e 10 sbm; 2 a/sba; 4 e 7 m/sbm; 5 e 6 sba; 8, 9 e 11 a | M/F | - | - | - | BEZZY et al. (1977) |
| | 20 (16 Mc e 4 mc) | - | 1; 3 e 10 sbm; 2 a/sba; 4 e 7 m/sbm; 6 sba; 5; 8 e 9 a | M/F | - | - | - | |

* $2n$ = número diploide; (Mc) macrocromossomos; (mc) microcromossomos. **O termo “acrocêntrico” foi padronizado na tabela, sendo utilizado inclusive nas descrições nas quais os autores relataram como telocêntricos. (m) metacêntrico; (sbm) submetacêntrico; (a) acrocêntrico; (sba) subacrocêntrico. (M) macho; (F) fêmea; (NF) número fundamental; (SS) sistema sexual; (NOR) região organizadora de nucléolo. (-) Não informado/especificado no artigo base.

CAPÍTULO V

Locomoção e adaptações morfológicas na cobra-de-vidro *Ophiodes cf. fragilis* (Raddi, 1820) (Squamata: Anguidae)

1- INTRODUÇÃO

Os vertebrados terrestres sem membros tradicionalmente intrigam o ser humano (GANS, 1962; BARROS-FILHO et al., 2008; HOHL et al., 2014, 2017), particularmente pela sua morfologia, levantando questões quanto a sua locomoção. Os animais sem membros podem se mover utilizando métodos distintos (GANS e GASC, 1990); sendo conhecidos cinco métodos de locomoção em vertebrados terrestres sem membros: serpentina (= ondulação lateral ou locomoção em “S”, todo o corpo se move simultaneamente passando sobre o mesmo ponto); retilínea (deslocamento em linha reta), concertina (porção posterior do corpo fixada e porção anterior é estendida, com modificação da distância corpo-cauda), movimento lateral (= por alças laterais ou movimento em “J”, flexão lateral para o lado que é propagado posteriormente em todo corpo) e a locomoção em laço (= *lasso locomotion*, observado em serpente arborícola na qual a porção anterior do corpo estava posicionada em linha reta para cima e a porção posterior circundando o objeto a ser escalado) (ROCHA-BARBOSA et al., 2015; JAYNE, 2020; SAVIDGE et al., 2021). Algumas espécies podem se locomover utilizando mais de um tipo de movimento, inclusive ao mesmo tempo (GANS, 1962; GANS e GASC, 1990).

A locomoção em cada linhagem de vertebrados está relacionada com a organização estrutural do organismo e principalmente com uma associação entre estabilidade, manobrabilidade, capacidade energética e resistência (ROCHA-BARBOSA et al., 2015). A forma que um animal se locomove está diretamente relacionada com fatores biológicos e ecológicos específicos. A capacidade locomotora está diretamente associada à ecologia dos animais já que a mesma está relacionada às partes do habitat acessíveis (IRSCHICK e GARLAND, 2001); podendo ser diretamente influenciada por fatores como o tamanho e formato corporal, proporção dos membros, patas e dedos, além de condições ambientais como temperatura, substrato, inclinação e diâmetro dos apoios (ROCHA-BARBOSA et al., 2015).

Em répteis, a ausência ou redução de membros evoluiu de maneira independente nos grupos e, na maioria dos casos, está associada a animais escavadores ou que se movem pela grama (PIANKA e VITT, 2003; CAMAITI et al., 2021). Um dos grandes enigmas

ecomorfológicos é identificar o quanto uma característica morfológica determina o desempenho de um indivíduo, como forrageamento (procura de alimento), predação (fuga de predadores) e reprodução (corte e cópula) (SATHE e HUSAK, 2015). Para analisar uma característica morfológica é essencial conhecer como esta funciona (LOSOS, 1990) e como influencia no desempenho ambiental do animal.

Gans (1962) destacou a necessidade de estudos de locomoção com vertebrados sem membros. Grande parte desses estudos, quando se trata de répteis, foram realizados com serpentes e anfisbenas (GANS, 1962). A locomoção em lagartos ápodos foi descrita em duas espécies: *Pseudopus apodus* (Pallas, 1775) e *Anguis fragilis* Linnaeus, 1758, ambos da família Anguillidae (GANS e GASC, 1990; GASC e GANS, 1990). Para o anguídeo do gênero *Ophiodes*, Rocha-Barbosa et al. (1991) descreveram movimentos relacionados a parturição de um espécime fêmea em cativeiro. Diante da diversidade de espécies de lagartos ápodos existentes, considerando os diferentes habitats que ocupam, ainda permanece a lacuna sobre a forma e morfologia funcional da locomoção nestes animais.

O gênero *Ophiodes* é composto por lagartos com o formato do corpo serpentiforme, com membros anteriores ausentes e membros posteriores rudimentares (também denominados vestigiais), sendo conhecidos popularmente como cobras-de-vidro, lagartos-de-vidro ou quebra-quebra (BORGES-MARTINS, 1998; PIZZATO, 2005; OLIVEIRA et al., 2016). Este gênero é exclusivamente neotropical e pode ser encontrado na Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil (UETZ et al., 2021). Diversos aspectos biológicos e ecológicos de *Ophiodes* ainda não foram elucidados. Este fato está relacionado principalmente a difícil captura e coleta de espécimes devido aos diferentes fatores, como por exemplo o hábito de vida criptozoico/semifossorial (VITT e CALDWELL, 2014). A raridade de estudos com espécies do gênero também é refletida na falta de análises taxonômicas, fazendo com que alguns pesquisadores acreditem que *Ophiodes* compreenda mais espécies do que as já descritas (BORGES-MARTINS, 1998; CACCIALI e SCOTT, 2015). Os espécimes analisados no presente estudo possuem características atribuídas a espécie candidata *Ophiodes* sp. 2 (BORGES-MARTINS, 1998). Por ainda não ter sido descrita oficialmente e os espécimes deste estudo apresentarem características morfológicas mais próximas a *Ophiodes fragilis*, optamos por nomeá-los como *Ophiodes* cf. *fragilis*.

Tendo em vista a importância de se conhecer os métodos de locomoção e as estruturas relacionadas a este comportamento somado a necessidade de estudos sobre locomoção em lagartos sem membros, objetivamos investigar o modo de locomoção em *Ophiodes* cf. *fragilis*

analisando: (1) os tipos de locomoção apresentados; (2) a possível utilidade dos membros posteriores para locomoção; e (3) características morfológicas associadas à sua locomoção.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Espécimes Analisados

Ao total, dez espécimes adultos de *Ophiodes* cf. *fragilis* foram utilizados no presente estudo; sendo dois espécimes (ambos adultos, sem autotomia aparente) utilizados para análise do comportamento locomotor, três espécimes (dois adultos e um juvenil) para análise de diafanização e cinco espécimes (adultos, totalizando dez membros posteriores) para a análise histológica (Tabela 2). O fato dos espécimes estudados serem de sexo diferente não interferiu nas análises realizadas uma vez que não objetivamos investigar o efeito sexual na locomoção e na sua morfologia associada. A coleta e manipulação seguiram as determinações válidas nas autorizações do SISBIO nº 59680/3 e no Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora protocolo 040/2017.

Os espécimes processados segundo os métodos de diafanização e histologia pertencem a Coleção Herpetologia da Universidade Federal de Juiz de Fora – Répteis (CHUFJF - Répteis). Para a técnica de diafanização, os espécimes de interesse foram necropsiados e as vísceras foram removidas. Já para a análise histológica, apenas a peça de interesse foi seccionada.

Os espécimes utilizados para a análise de comportamento locomotor foram eutanasiados após os experimentos seguindo a Gomides et al. (2013). Todos os espécimes utilizados neste estudo estão depositados na CHUFJF-Répteis com os números de depósito: 205, 1423, 1473, 1643, 1646, 1649, 1650, 1731, 1866 e 1867. A biometria dos espécimes foi realizada utilizando uma fita métrica e um paquímetro digital de precisão, uma vez que são fixados de forma padrão para espécimes com corpo serpentiforme – “enrolados”; devido à ocorrência de autotomia caudal em alguns espécimes analisados, foi aferido apenas o comprimento rostro-cloacal (SVL) (Tabela 2).

Tabela 2: Espécimes de *Ophiodes* cf. *fragilis* analisados com suas respectivas biometrias, identificação sexual e localidades em que foram coletados.

| Número de Depósito (CHUFJF-Répteis)* | Análise | SVL (mm)** | Sexo |
|---|------------|------------|-------|
| 205 | Histologia | 143,37 | Fêmea |

| | | | |
|------|--------------|--------|-----------------|
| 1423 | Diafanização | 63,19 | Macho (juvenil) |
| 1473 | Histologia | 144,13 | Fêmea |
| 1643 | Histologia | 129,47 | Macho |
| 1646 | Histologia | 127,01 | Fêmea |
| 1649 | Histologia | 140,25 | Fêmea |
| 1650 | Diafanização | 114,61 | Macho |
| 1731 | Diafanização | 147,14 | Macho |
| 1866 | Locomoção | 153,58 | Macho |
| 1867 | Locomoção | 134,28 | Macho |

*CHUFJF-Répteis = Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Juiz de Fora – Répteis. **SVL = comprimento rostro-cloacal.

2.2- Comportamento Locomotor

Para investigar o comportamento locomotor, os dois espécimes adultos de *Ophiodes cf. fragilis* foram testados em quatro superfícies diferentes (adaptadas de GANS e GASC, 1990 e GASC e GANS, 1990): areia (grãos pequenos e leves), lixa (superfície áspera), placa de vidro (superfície lisa) e madeira lisa com pregos (derivação); com o objetivo de analisar como os espécimes movimentavam o corpo e os membros posteriores (Figura 32).

As diferentes superfícies foram dispostas em uma caixa de madeira de 100 cm x 100 cm x 15 cm (comprimento x largura x altura); sendo esta dividida em quatro partes, de 100 cm x 25 cm (comprimento x largura), com uma barreira entre as superfícies distintas de modo que o animal não tivesse contato a mais de uma superfície simultaneamente. Os pregos foram dispostos em quatro linhas retas, separadas por 5 cm. Os espécimes foram filmados com a câmera Kodak PixPro AZ522 por 5 minutos em cada substrato, com repetição no intervalo de uma semana. As filmagens foram realizadas com cada um dos espécimes de maneira isolada e alternada para evitar / reduzir o estresse por manipulação e estimulação. Os espécimes foram estimulados a movimentação, através do toque na ponta da cauda, sempre que permaneciam imóveis sobre as diferentes superfícies.

O membro posterior foi analisado através da observação quadro a quadro do vídeo produzido em cada substrato. Através do vídeo, foi tirada uma foto sempre que os espécimes movimentavam os membros posteriores (independente se movimentavam apenas um lado ou ambos) para posterior mensuração do ângulo de abertura. O ângulo de abertura foi calculado para cada substrato separadamente usando o ImageJ v. 1.45. Para averiguar a existência de

variação significativa entre os ângulos medidos nos diferentes substratos, foi realizado o teste estatístico Kruskal-Wallis no programa R v. 3.5.3.

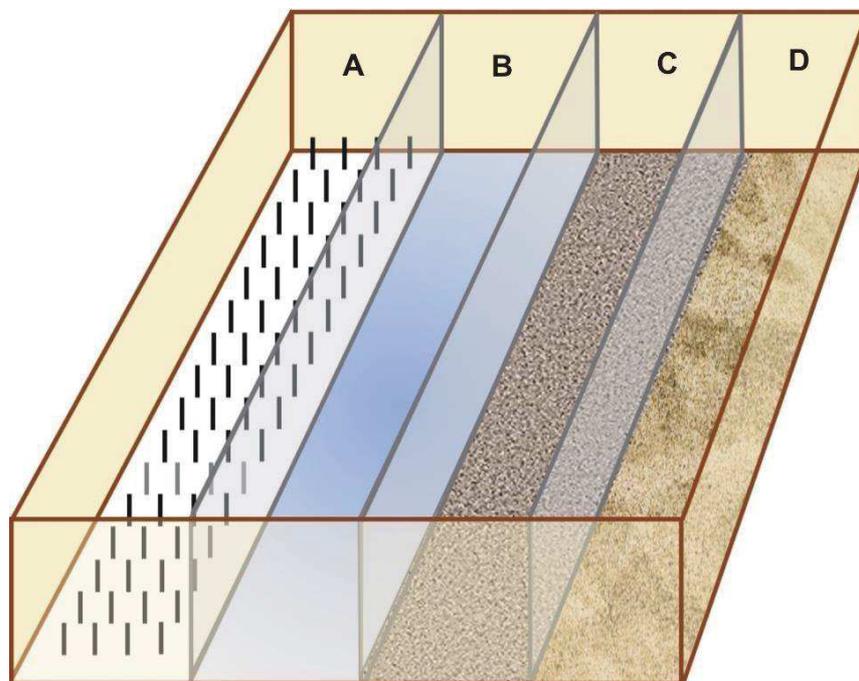


Figura 32: Desenho esquemático da pista utilizada para a análise do modo de locomoção em *Ophiodes cf. fragilis*. (A) madeira com pregos, (B) placas de vidro, (C) lixa e (D) areia.

2.3- Diafanização

O método de diafanização utilizado foi o de Silveira et al. (2013). As amostras foram colocadas em frascos transparentes com solução de hidróxido de potássio a 2% (KOH a 2%) para clarificar as estruturas externas do animal. Essa solução foi trocada diariamente, até a clarificação das amostras. Este procedimento ocorreu por cerca de 40 dias em espécimes adultos e 16 dias no juvenil. Após o procedimento de clarificação, as amostras foram submetidas ao processo de coloração com alizarina a 1% (1 g de alizarina Red S em 90 ml de etanol) para coloração das estruturas ósseas, por um período de 24 h. No final deste processo, as amostras foram lavadas com solução de KOH a 2% e glicerina 3:1 por 24 h. A cada 24 h, a proporção de KOH 2% e glicerina era alterada na seguinte ordem: (2:1), (1:1), (1:2), (1:3) até serem acondicionadas em glicerol puro com algumas gotas de KOH 2 % em potes de vidro transparente.

A análise do material e a respectiva documentação fotográfica foram realizadas em estereomicroscópio da Olympus SZX16 com equipamento fotográfico digital Canon A3100S e ocular micrométrica acoplada.

2.4- Histologia

Para estudos de material de microscopia de luz, os membros posteriores e as escamas ventrais de espécimes de *Ophiodes cf. fragilis* foram desidratados em concentrações crescentes de álcool, clarificados com xilol e impregnado / embebido em parafina. Posteriormente, foram feitos cortes seriados com espessura de 4 µm. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) (TOLOSA et al., 2003).

A análise do material e a respectiva documentação fotográfica foram realizadas sob um microscópio Olympus BX41 com equipamento fotográfico digital Canon A3100S e ocular para micrômetro acoplada.

3- RESULTADOS

3.1- Locomoção

Os métodos de locomoção observados foram, predominantemente, o retilíneo e o serpentina; verificados nos quatro tipos distintos de superfície (areia, lixa, placa de vidro e madeira com pregos), indicando que a mesma não influenciava ou favorecia o método de locomoção observado. O resumo dos resultados obtidos foi apresentado na Tabela 3.

O movimento retilíneo (Figura 33a,b) foi observado quando o animal se locomovia em linha reta, mesmo quando a superfície era composta por obstáculos (pregos) (Figura 34a-c). Esse tipo de movimento se iniciava, em sua grande maioria, na porção anterior do corpo do animal (cabeça/início do tronco) e era disseminado por todo restante do corpo, até a cauda (Figura 33a). Também foi observado este tipo de movimento se iniciando na região mediana do corpo (cloacal) e se estendendo até a ponta da cauda.

Consideramos a disposição em “U” como uma variação do movimento retilíneo. O mesmo se caracterizou de forma similar ao retilíneo: se iniciando em uma porção do corpo, geralmente na cabeça, e “puxando” o restante do corpo em linha reta (Figura 33b). Como o nome indica, o animal movimentava o corpo formando um meio arco, mas este não caracterizou um movimento serpentina. A disposição em “U” foi observada principalmente quando o animal modificava a direção do movimento.

Tabela 3: Resumo dos resultados obtidos no presente estudo de locomoção e morfologia associada de *Ophiodes cf. fragilis*.

| Variável Analisada | Resultados | |
|---|---|----------------------------------|
| Tipos de locomoção | Retilínea e Serpentina | |
| Comprimento Rostro-Cloacal (média em mm)* | 138,69 (fêmea) | 135,81 (macho) |
| Cauda regenerada | Sim (n = 1) | Não (n= 9**) |
| Ângulo de Abertura | 52° - 55° (areia, lixa e madeira com pregos) | 60° (placa de vidro) |
| Idade | Juvenil (n = 1) | Adulto (n = 9) |
| Membro vestigial* (média em mm) | 4,07 (fêmea) | 5,88*** (macho) |
| Sexo | Fêmea (n = 4) | Macho (n = 6) |
| Biomias | Cerrado (Ritápolis, Ribeirão Vermelho) | Mata Atlântica (Juiz de Fora) |

*Calculado para fêmeas e machos adultos. ** Sem autotomia aparente. *** Não há medida de membro vestigial de um espécime macho.

Não foi observado o uso dos membros posteriores na superfície de madeira com pregos; no entanto, o membro posterior se afastou da lateral do corpo em alguns momentos. O ziguezague entre os pregos foi realizado principalmente pelos movimentos retilíneo e serpentina (quando desviava dos pregos). Nesta superfície, os espécimes demonstraram uma preferência por se locomover em linha reta quando possível, como que seguindo uma linha imaginária como guia.

O movimento serpentina (Figura 33c) apresentou variações quanto a amplitude do “S” formado; no entanto, esta não foi calculada. A locomoção do tipo serpentina apresentou-se tanto em momentos que o animal estava forrageando pela superfície, quanto quando o mesmo se sentia incomodado (ex.: diante do estímulo para locomoção). Nestes momentos foi possível observar a variação da amplitude do “S”, sendo que diante de uma possível ameaça a amplitude

foi maior do que quando o animal não se sentia em perigo. Com a maior amplitude do “S” também se observou maior velocidade (entretanto esta não foi aferida), este fato provavelmente está relacionado a percorrer uma maior distância territorial em um tempo menor, possibilitando a fuga do animal.

A disposição em laço foi notada quando o animal ficava imóvel nas diferentes superfícies (Figura 33d,e). O laço foi observado desde uma forma mais complexa (com dois ou mais nós) (Figura 33e) quanto em uma forma mais simples (um único nó) (Figura 33d). De acordo com o movimento do animal, o laço se desfazia da porção do corpo que iniciava até a ponta da cauda. Este parece ser um comportamento comum da espécie, uma vez que foi observado nestes espécimes mesmo quando não estavam em teste.

Observamos o movimento vertical nos espécimes principalmente quando estavam forrageando pelas superfícies. Os animais atingiram alturas diferentes verticalmente, podendo sustentar até a metade do tronco sem contato com a superfície. Este movimento também foi observado durante o forrageio (observações pessoais).

Ambos os espécimes afastaram o membro posterior da lateral do corpo e o movimentaram com frequência em três das quatro superfícies testadas, sendo mais frequente respectivamente nas superfícies de areia, lixa e placa de vidro. Os animais indicaram ter controle quanto ao uso do membro de apenas um lado ou de ambos os lados, provavelmente estando associado à necessidade locomotora do animal. Os membros posteriores apresentaram diferentes ângulos de abertura sendo observado uma média de aproximadamente 54° ($\pm 22^{\circ}$, $n = 10$) no substrato de areia, 55° ($\pm 22,6^{\circ}$, $n = 8$) na lixa, 60° ($\pm 17,5^{\circ}$, $n = 8$) na placa de vidro e de 52° na madeira com pregos ($\pm 40,4^{\circ}$, $n = 2$), sendo a variação de angulação entre os substratos não significativa (Kruskal-Wallis chi-squared = 0,52339, $p = 0,9137$).

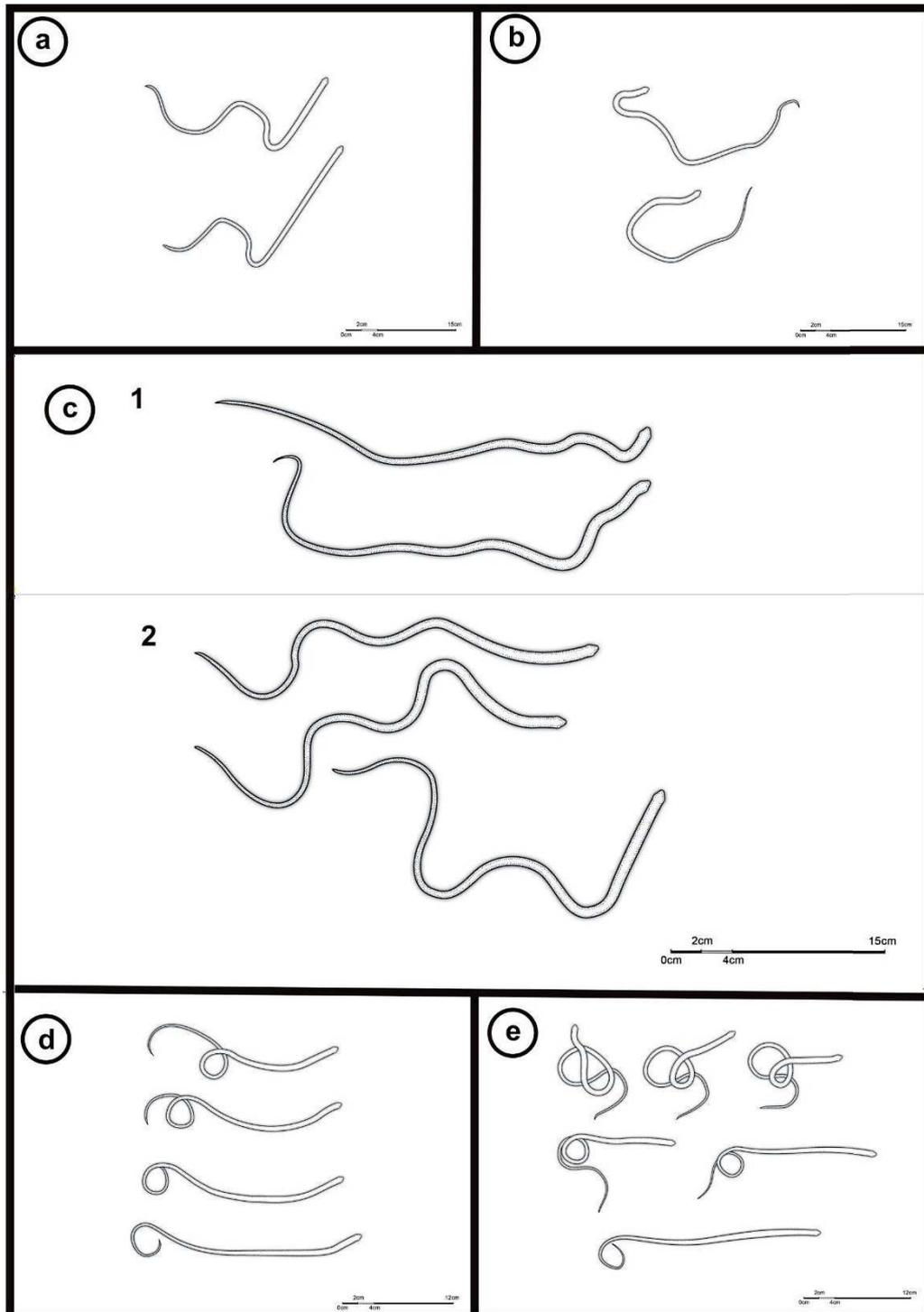


Figura 33: Desenhos esquemáticos dos movimentos locomotores observados em *Ophiodes* cf. *fragilis*. (a, b) Movimento retilíneo; destaque em (b) para o movimento “U”. (c 1 e 2) Movimento serpentina; ênfase nas diferentes amplitudes do “S”. (d, e) Disposição em laço; ênfase na complexidade do laço em (e).

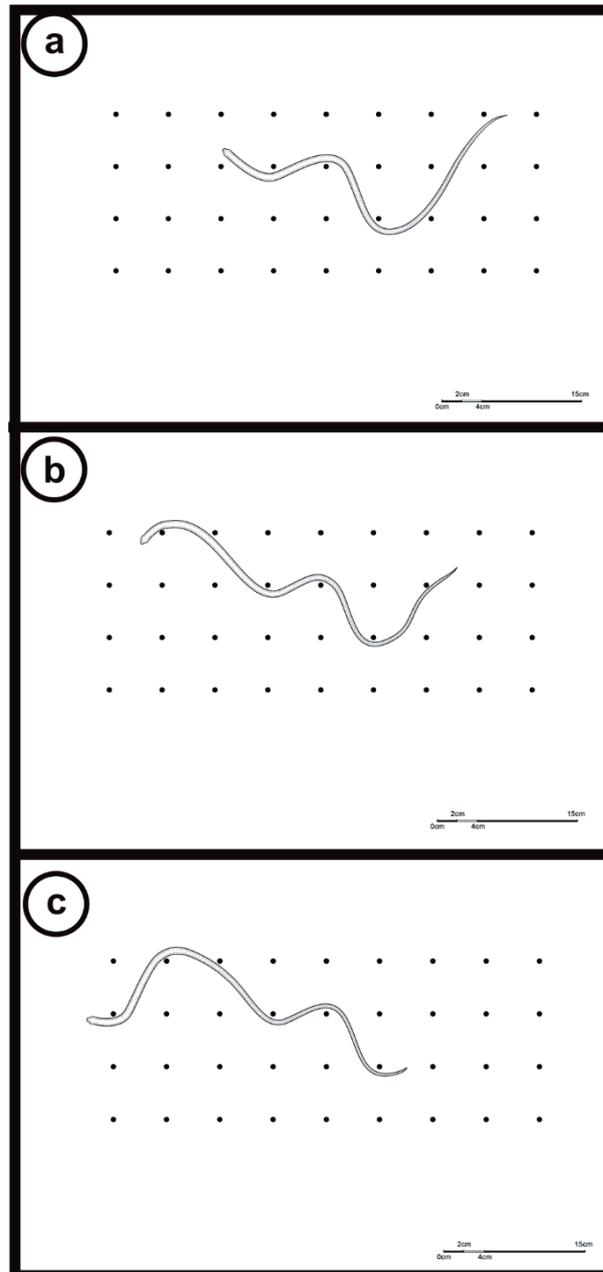


Figura 34: Desenho esquemático da locomoção entre os pregos de *Ophiodes cf. fragilis* (a-c).

3.2- Morfologia associada à locomoção

A coloração da estrutura óssea de *Ophiodes cf. fragilis* por alizarina através da técnica de diafanização confirmou estruturas já conhecidas e revelou novos dados, sendo estes corroborados pela análise histológica.

Nos espécimes adultos a estrutura esquelética não foi corada (Figura 35b). Enquanto a parte muscular externa e escamas do animal coraram de roxo (Figura 35b,f). Este fato está associado a presença de osteodermos nas escamas (Figura 35f), identificado pelos canaliculos do sistema radix em formato de nuvem. Com a composição de cálcio nos osteodermos, o corante acumulou-se na porção muscular e escamas, fazendo dessa estrutura uma “barreira” para a passagem de corante para o esqueleto nos espécimes analisados. Esta camada de osteodermos nas escamas foi confirmada através do processamento histológico (Figura 36e). No juvenil analisado observou-se um resultado diferente do usual, com a alizarina corando fortemente a estrutura óssea (Figura 35c-e).

Com a coloração do esqueleto foi identificada uma estrutura óssea fina, longitudinal, na porção superior da cloaca, indicando ser uma cintura pélvica (Figura 35d,e). Essa estrutura apresentou um contato direto com os membros posteriores. Cada membro posterior apresentou três ossículos, sendo um na porção proximal e dois na porção distal (se dispunham lado a lado), indicando ser os ossos fêmur, tíbia e fíbula bastante reduzidos (Figura 35c-e). A presença dos três ossículos nos membros posteriores foi confirmada por histologia (Figura 36). Entre os ossículos proximal e os dois distais há uma camada de tecido cartilaginoso e no interior dos mesmos foi observada alta atividade celular relacionada a produção de células ósseas e vascularização (Figura 36e,f). Este fato indica uma atividade funcional da estrutura, uma vez que a mesma possui atividade metabólica.

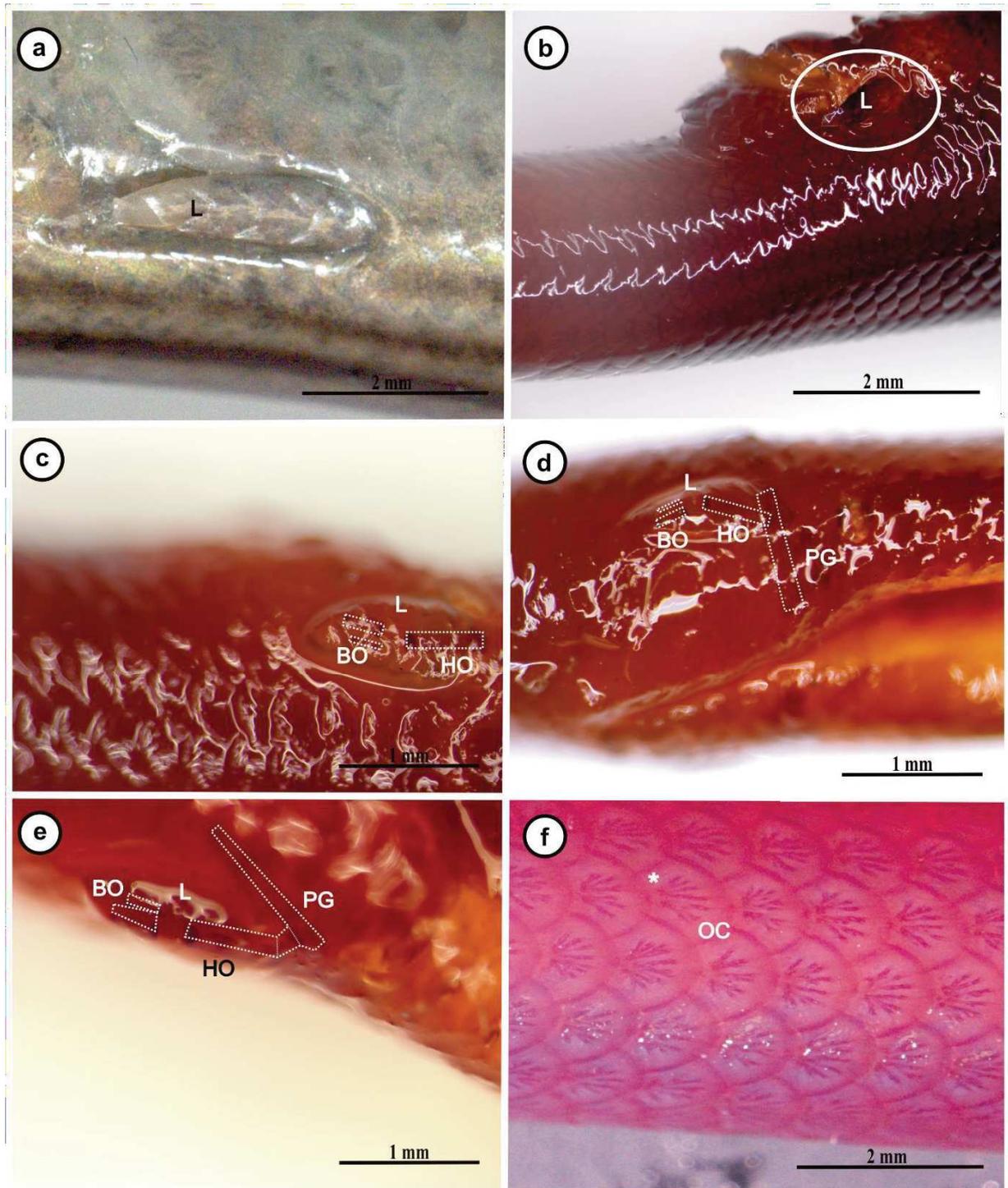


Figura 35: Fotografias do membro posterior esquerdo (a); membros posteriores do adulto (destacados pelo círculo branco - a) e do juvenil (proeminentes aos ossículos e cintura pélvica em linha pontilhada branca - c, d, e); e escamas e osteoderms (f) dos espécimes diafanizados de *Ophiodes cf. fragilis* analisado. (L) membro posterior; (BO) ossículos distais; (HO) ossículo proximal (PG) cintura pélvica; (OC) canalículos osteoderms; (*) Escamas.

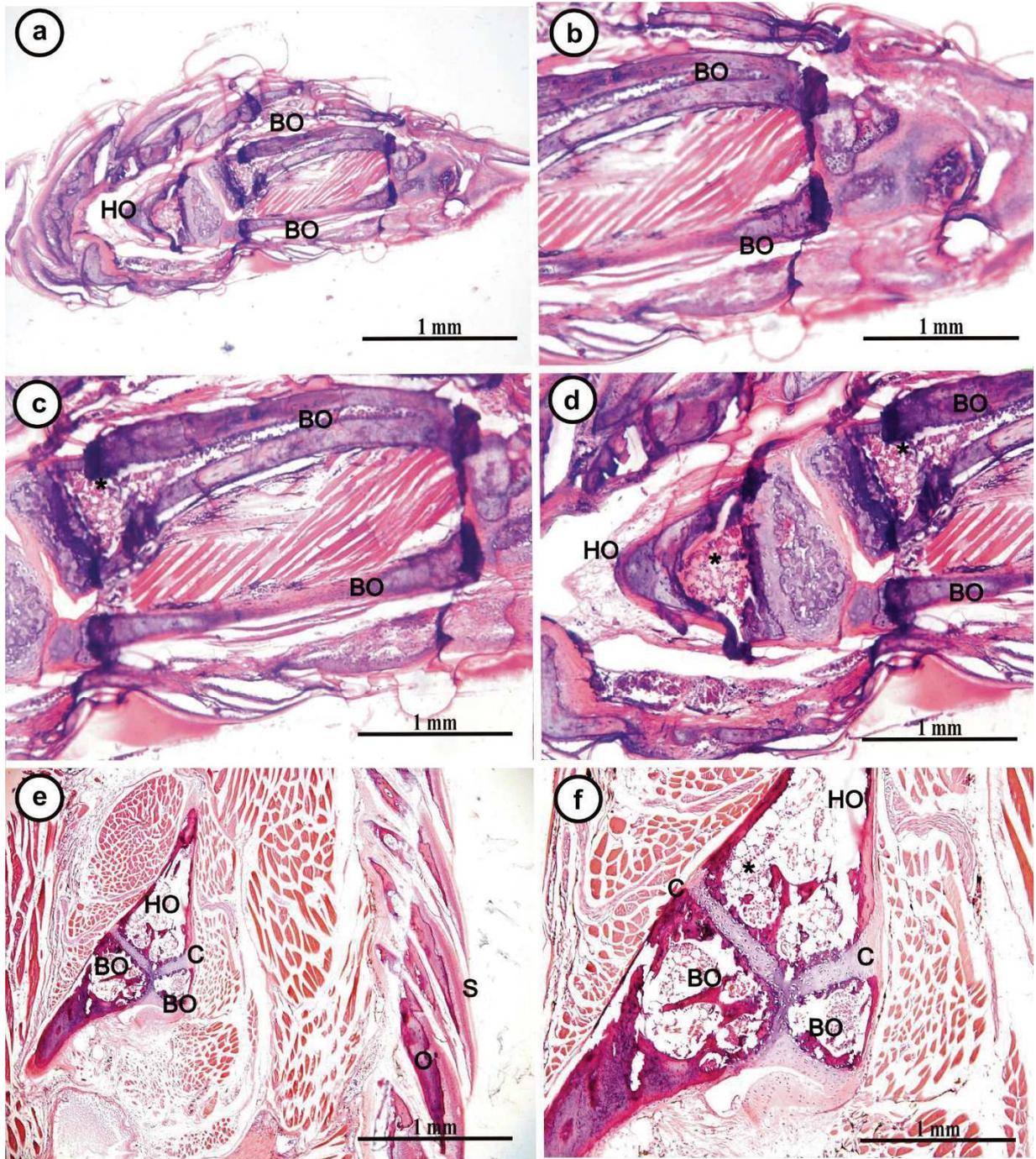


Figura 36: (a, b, c, d, e, f) Fotomicrografias de membros posteriores de *Ophiodes* cf. *fragilis* corado com hematoxilina e eosina. (BO) ossículos distais; (HO) ossículo proximal; (C) cartilagem; (S) escamas; (O) osteodermos; (*) células sanguíneas indicando atividade metabólica. Ampliação: 4x - a, e; 10x - b, c, d, f.

4- DISCUSSÃO

Este estudo oferece novos relatos sobre a locomoção e a morfologia associada a este comportamento em *Ophiodes cf. fragilis*, contribuindo assim para o estudo de adaptações para locomoção em vertebrados sem membros. *Ophiodes cf. fragilis* apresenta como métodos de locomoção predominantes o retilíneo e a serpentina. Destaca-se nessa espécie o uso dos membros posteriores como possível meio de otimizar a locomoção. Tal fato sugere que esses membros não sejam um vestígio de membros, mas sim membros posteriores bastante reduzidos que possuem uma atividade funcional para o indivíduo. A utilidade de membros vestigiais posteriores de serpentes boideos, foi observada por Carpenter et al. (1978), nas quais os denominados esporões são funcionais auxiliando os machos durante a corte (combate entre machos) e a cópula (domínio da fêmea). Função semelhante foi defendida por Montechiaro et al. (2011) ao verificarem que machos de *Ophiodes cf. striatus* apresentavam os membros posteriores significativamente maiores do que as fêmeas.

A locomoção de lagartos anguideos sem membros era compreendida na forma de serpentina, na qual a ondulação lateral ocorria através de porções do corpo do animal que eram empurradas contra o substrato (PIANKA e VITT, 2003). Contudo, também observamos a forma de locomoção retilínea. A locomoção retilínea não foi ainda descrita para lagartos sem membros com corpo serpentiforme, sendo compreendida apenas para o clado das serpentes já que estas possuem os músculos costocutâneos inferior e superior permitindo que a locomoção retilínea aconteça (JAYNE, 2020). Estes músculos costocutâneos aparentemente estão ausentes em lagartos sem membros e com corpo serpentiforme (JAYNE, 2020). Desta forma, estudos de anatomia muscular são indicados para a confirmação da ausência desta musculatura em *Ophiodes cf. fragilis* associado a estudos detalhados dos mecanismos relacionados a locomoção retilínea em lagartos sem membros.

A movimentação do membro posterior em diferentes angulações, nos diferentes substratos analisados, foi observada. Apesar de o ângulo de abertura do membro posterior não variar significativamente entre os diferentes substratos testados, o afastamento da lateral do corpo e a movimentação do mesmo pode estar relacionada a uma maior estabilidade do animal, o que poderia inferir em uma maior agilidade para otimizar a locomoção em diferentes substratos. É importante analisar a resposta a diferentes tipos de superfícies devido a diversidade de composição de habitats que estas espécies podem ocupar (IRSICHICK e GARLAND, 2001); além disso, diferentes substratos podem diminuir ou aumentar o desempenho e a performance de um indivíduo (HERREL et al., 2008; SATHE e HUSAK, 2015)

como a proteção de território, fuga de predadores, procura da presa, dentre outros. A locomoção é de extrema importância ecológica para as espécies, afetando seu desempenho em diferentes funções vitais como fugir de predadores, encontrar alimento e parceiros e defender o território (AERTS et al., 2000). Estudos como os de Sathe e Husak (2015) e Zamora-Camacho (2018) testam o desempenho e a performance da locomoção em lagartos com membros, sendo este um campo ainda não elucidado para lagartos sem membros. Tal fato pode ter relação direta à dificuldade de captura e coleta destas espécies, relacionado principalmente a características morfológicas e fisiológicas destes animais, o que interfere no conhecimento de características básicas de comportamento, incluindo a locomoção. Nós não analisamos o desempenho e a performance locomotora de *Ophiodes cf. fragilis*, sendo uma área promissora para estudos futuros.

Os osteodermos apresentam uma grande variação intraespecífica com relação a formato e composição, sendo amplamente utilizado na sistemática de Anguidae (ZYLBERBERG e CASTANET, 1985; BUFFRÉNIL et al., 2010; BOCHATON et al., 2015). Bochaton et al. (2015) destacam que os osteodermos encontrados em Diploglossinae e *Anguis* sp. são arredondados, não biselados, o que permite uma blindagem flexível, sendo este supostamente uma sinapomorfia de Anguidae. Os osteodermos de *Ophiodes* foram descritos por Strahm e Schwartz (1977). Os referidos autores destacaram que em *Ophiodes* os osteodermos seriam derivados, quanto a morfologia e composição, do gênero *Diploglossus*, apresentando como principal característica a presença de um sistema radix (canais no interior dos osteodermos) extenso e em forma de nuvem. Tal arquitetura apresentada por Strahm e Schwartz (1977) foi confirmada em nosso estudo com a técnica de diafanização. Nós analisamos apenas a morfologia dos osteodermos ventrais na região cloacal, e constatamos que há diferença entre juvenis e adultos. A diferença observada na coloração na técnica de diafanização pode estar relacionada a variação da composição das escamas entre espécimes juvenis e adultos. Possivelmente por se tratar de um juvenil, com pouco tempo de vida fora do corpo materno, o acúmulo de cálcio nas escamas era inferior ao que foi encontrado nos espécimes adultos estudados. Apesar de ser considerado um carácter taxonômico importante em Anguidae, os osteodermos podem apresentar variação quanto a posição (cabeça, tronco, cauda, ventral e dorsal), idade (juvenil e adulto) e condição (regenerado ou não regenerado) (BOCHATON et al., 2015). Sendo assim, análises dos osteodermos de *Ophiodes cf. fragilis* ainda são preliminares, assim como em outras espécies pertencentes a este gênero e família, sendo necessária uma descrição mais aprofundada viabilizando a utilização desta estrutura na taxonomia do grupo.

A morfologia do esqueleto apendicular é pouco conhecida em diversas espécies com membros reduzidos ou ausentes (ANDRADE et al., 2016). A existência de ossos nos membros posteriores, apresentando um metabolismo celular, indica uma atividade funcional constante dessa estrutura no indivíduo. Ressalta-se também que o membro posterior apresenta diferentes tamanhos em espécimes juvenis e adultos, este crescimento pode ocorrer concomitantemente ao crescimento corporal a cada muda (ROCHA-BARBOSA et al., 2015). Estruturas biológicas vestigiais fornecem uma importante linha de evidência para a macroevolução (ANDRADE et al., 2016), uma vez que podem ser consideradas reflexos evolutivos dos efeitos históricos dos micro-habitats e do ambiente biótico (PIANKA e VITT, 2003). Nossos dados evidenciam a existência de ossos nos membros posteriores bastante reduzidos e funcionais em *Ophiodes*, sendo assim sugerimos o uso da nomenclatura membro posterior reduzido, ao invés de membro posterior vestigial.

Os membros posteriores reduzidos de *Ophiodes cf. fragilis* foram pela primeira vez descritos quanto à sua morfologia e função. Os tipos de locomoção em diferentes substratos observadas foram a serpentina e a retilínea, sendo esta última associada pela primeira vez ao modo locomotor de uma espécie de lagarto de corpo alongado e sem membros (ou com membros reduzidos). Os traços funcionais desempenham importante papel na estrutura da comunidade e no funcionamento do ecossistema (CIANCIARUSO et al., 2009); e estes, por sua vez, são altamente variáveis devido à adaptação local ou a plasticidade fenotípica em resposta a diferentes características ambientais ou interações bióticas (ALBERT et al., 2012). Muito ainda falta a esclarecer sobre as adaptações morfológicas e fisiológicas que esta espécie e outras de vertebrados sem membros sofreram para se adequar ao ambiente em que vivem. Apesar disso, nossos dados preenchem algumas lacunas e criam novas perguntas a serem respondidas sobre os modos e adaptações da morfologia associada à locomoção em lagartos sem membros ou com membros reduzidos.

CONCLUSÕES

- ❖ O dimorfismo sexual de forma e tamanho de variáveis do corpo, da cabeça, de escamas da cabeça e formato do membro vestigial está ausente nos espécimes de *Ophiodes cf. fragilis* analisados.
- ❖ As análises realizadas demonstraram que os espécimes de *Ophiodes cf. fragilis* são morfológicamente distintos dos espécimes de *Ophiodes fragilis* com relação ao tamanho do corpo, da cabeça e do membro vestigial e ao formato do membro vestigial. Os resultados indicaram ausência de variação entre as espécies relacionada as escamas dorsais e laterais da cabeça analisadas.
- ❖ A variação morfológica de órgãos relacionados a reprodução foram aqui descritas pela primeira vez para uma espécie de *Ophiodes*. As características macro e microscópicas são similares as anteriormente observadas em outras espécies de Squamata. Destaca-se a presença de segmento sexual no rim de machos e fêmeas adultas analisadas. Os resultados obtidos com espécimes pertencentes exclusivamente à Coleção Científica são relevantes e aplicáveis para comparações em estudos futuros com outras espécies do gênero.
- ❖ A morfologia macro e microscópica do hemipênis e hemiclitoris de uma espécie de *Ophiodes* foi descrita de maneira conjunta e pioneira. Tais estruturas são consideradas uma sinapomorfia dos répteis Squamata, possuindo grande importância taxonômica, contribuindo assim para estudos taxonômicos futuros do gênero.
- ❖ *Ophiodes cf. fragilis* apresentou número cromossômico e morfologia dos cromossomos similares as previamente conhecidas para outras espécies de *Ophiodes*. O número cromossômico observado neste estudo ($2n = 36$) é o provável número cromossômico ancestral de Anguillidae. Novas técnicas de localização da região organizadora de nucléolo, sinalização da heterocromatina constitutiva e marcação de sequências de DNA repetitivo foram empregadas, alinhando a citogenética clássica e a citogenética molecular pela primeira vez para uma espécie do gênero. Estudos complementares com espécimes fêmeas são encorajados para determinação do sistema sexual, visto que apenas espécimes machos foram analisados.
- ❖ O estudo do comportamento locomotor e a morfologia associada indicou que *Ophiodes cf. fragilis* se movimenta habitualmente de forma serpentina e retilínea, independente do substrato. Apesar de ser conhecido como “membro vestigial”, o membro posterior apresentou movimento em algumas situações específicas da locomoção. A cintura pélvica se mostrou evidente. Ossículos diminutos estão presentes no membro posterior, com

indicação de atividade metabólica. Tais resultados obtidos reforçam a hipótese de que o membro posterior de *Ophiodes* seria funcional e extremamente reduzido. A forma e erradiação dos canaliculos dos osteodermos dos espécimes analisados foram similares ao anteriormente descrito para o gênero.

O presente estudo analisou aspectos da história natural de *Ophiodes* cf. *fragilis*, resultando em novas informações sobre dados morfológicos, reprodutivos, citogenéticos e comportamentais. Algumas análises e resultados obtidos neste estudo foram apresentados pela primeira vez para uma espécie de *Ophiodes*, contribuindo assim para estudos futuros com o gênero. Estudos complementares são incentivados para um melhor conhecimento destes aspectos na espécie e no gênero.

REFERÊNCIAS

- AERTS, P.; VAN DAMME, R.; VANHOOYDOCK, B.; ZAAF, A.; HERREL, A. Lizard locomotion: how morphology meets ecology. **Netherlands Journal of Zoology**, 50: 261-277. 2000.
- ALBERT, C.H.; BELLO, F.; BOULANGEAT, I.; PELLET, G.; LAVOREL, S.; THRUILLER, W. On the importance of intraspecific variability for the quantification of functional diversity. **Oikos**, 121, 116-126. 2012.
- ALVES, M.L.M.; VIEIRA, M.I.; FABÍAN-BEURMANN, M.E. Contribuição ao conhecimento da osteologia craniana de *Ophiodes striatus* (Spix, 1824) (Lacertilia-Aguidae). **Iheringia**, 55: 121-135. 1980.
- ANDRADE, J.B.; LEWIS, R.P.; SENTER, P. Appendicular skeletons of five Asian skink species of the genera *Brachymeles* and *Ophiomorus*, including species with vestigial appendicular structures. **Amphibia-Reptilia**, 37: 337-344. 2016.
- ARNOLD, E. N. The hemipenis of lacertid lizards (Reptilia: Lacertidae): structure, variation and systematic implications. **Journal of Natural History**, 20: 1221–1257. 1986a.
- ARNOLD, E. N. Why copulatory organs provide so many useful taxonomic characters: the origin and maintenance of hemipenial differences in lacertid lizards (Reptilia: Lacertidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, 29: 263–281. 1986b.
- AX, P. Rhynchocephalia – Squamata. In: **Multicellular Animals**. Springer, Berlin, Heidelberg. pp 239-244. 2003.
- BARBO, F.E.; MALAGOLI, L.R.; BAJESTERO, F.B.; WHATELY, M. Os Répteis no Município de São Paulo: aspectos históricos, diversidade e conservação. In: MALAGOLI, L.R.; BAJESTERO, F.B.; WHATELY, M. **Além do Concreto: contribuições para a proteção da biodiversidade paulistana**. Editora Instituto Socioambiental, São Paulo, 36p. 2008.

BARROS, V.A.; ROJAS, C.A.; ALMEIDA-SANTOS, S.M. Mating plugs and male sperm storage in *Bothrops cotiara* (Serpentes, Viperidae). **Herpetological Journal**, 27: 115-119. 2017.

BARROS, E.H.; TEIXEIRA, R.L. Diet and fecundity of the Glass-lizard, *Ophiodes striatus* (Sauria, Anguillidae) from the Atlantic Forest in southeastern Brazil. **Boletim do Museo de Biologia Mello Leitão**, 22: 11-23. 2007.

BARROS-FILHO, J.D.; HOHL, L.S.L.; ROCHA-BARBOSA, O. Excavatory cycle of *Leposternon microcephalum* Wagler, 1824 (Reptilia, Amphisbaenia). **International Journal of Morphology**, 26: 411-414. 2008.

BEÇAK, M.L.; BEÇAK, W.; DENARO, L. Chromosome polymorphism, geographical variation and karyotypes in Sauria. **Caryologia**, 25: 313- 326. 1972.

BENÍTEZ, H.A.; PÜSCHEL, T.A. Modelando la varianza de la forma: morfometría geométrica aplicaciones en biología evolutiva. **International Journal of Morphology**, 32: 998-1008. 2014.

BERNARDO, P.H.; PIRES, M.R.S. *Ophiodes striatus*: reproduction. **Herpetological Review**, 37: 469-470. 2006.

BEZY, R.K.; GORMAN, G.C.; KIM, Y.J.; WRIGHT, J.W. Chromosomal and genetic divergence in the fossorial lizards of the family Anniellidae. **Systematic Zoology**, 57-71. 1977.

BLACKBURN, D.G. Viviparous placentotrophy in Reptiles and the parent-offspring conflict. **Journal of Experimental Zoology**, 9999: 1-17. 2015.

BLACKBURN, D.G. Structure, function and evolution of the oviducts of Squamate Reptiles, with special reference to viviparity and placentation. **The Journal of Experimental Zoology**, 282: 560-617. 1998.

BOCHATON, C.; BUFFRENIL, V.; LEMOINE, M.; BAILON, S.; INEICH, I. Body location and tail regeneration effects on osteoderms morphology – Are they useful tools for systematic,

paleontology, and skeletochronology in diploglossine lizards (Squamata, Anguinae)? **Journal of Morphology**, 276: 1333-1344. 2015.

BÖHME, W. Hemiclitoris discovered: a fully differentiated erectile structure in female monitor lizards (*Varanus* spp.) (Reptilia: Varanidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, 33:129-132. 1995.

BORGES-MARTINS, M. **Revisão taxonômica e sistemática filogenética do gênero *Ophiodes* Wagler, 1828 (Sauria, Anguinae, Diploglossinae)**. Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 239p. 1998.

BRAZ, H.B.; KASPEROVICZUS, K.N.; GUEDES, T.B. Reproductive biology of the fossorial snake *Apostolepis gaboi* (Elapomorhini): from a threatened and poorly known species from the Caatinga region. **South American Journal of Herpetology**, 14: 37-47. 2019.

BRAZ, H.B.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; MURPHY, C.R.; THOMPSON, M.B. Uterine and eggshell modifications associated with the Evolution of viviparity in South American water snakes (*Helicops* spp.). **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, 2018: 1-16. 2018.

BUFFRENIL, V.; SIRE, J.Y.; RAGE, J.C. The histological structure of glyptosaurine osteoderms (Squamata: Anguinae), and the problem of osteoderm development in Squamates. **Journal of Morphology**, 271: 729-737. 2010.

BURBRINK, F.T.; GRAZZIOTIN, F.G.; PYRON, R.A.; CUNDALL, D.; DONNELLAN, S.; IRISH, F.; KEOGH, S.; KRAUS, F.; MURPHY, R.W.; NOONAN, B.; RAXWORTHY, C.; RUANE, S.; LEMMON, A.R.; LEMMON, E.M.; ZAHER, H. Interrogating genomic-scale data for Squamata (Lizards, Snakes and Amphisbaenians) shows no support for key traditional morphological relationships. **Systematic Biology**, 69: 502-520. 2020.

BURY, R.B.; GORMAN, G.C.; LYNCH, J.F. Karyotypic data for five species of anguillid lizards. **Experientia**, 25: 314-316. 1969.

CACCIALI, P.; SCOTT, N.J. Key to the *Ophiodes* (Squamata: Sauria: Diploglossidae) of Paraguay with the description of a new species. **Zootaxa**, 3980: 42-50. 2015.

CACCIALI, P.; SCOTT, N.J. Revisión del género *Ophiodes* de Paraguay (Squamata: Anguillidae). **Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay**, 21: 1-8. 2012.

CAMAITI, M.; EVANS, A.R.; HIPSLEY, C.A.; CHAPPLE, D.G. A farewell to arms and legs: a review of limb reduction in squamates. **Biological Reviews**, Doi: 10.1111/brv.12690. 2021.

CAPULA, M.; LAPINI, L.; CAPANNA, E. The Karyotype of *Lacerta horváthi* (Reptilia, Sauria, Lacertidae). **Genetica**, 79: 11-16. 1989.

CAPUTO, L.F.G.; GITIARANA, L.B.; MANSO, P.P.A. Capítulo 3: Técnicas Histológicas. 89-188 p. *In*: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. (Orgs). **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2**. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. 290 p. 2010.

CAPUTO, V.; ODIERNA, G.; APREA, G. A chromosomal study of *Eumeces* and *Scincus*, primitive members of the Scincidae (Reptilia, Squamata). **Bolletino di Zoologia**, 61: 155-162. 1994.

CARD, W.; KLUGE, A.G. Hemipenial skeleton and varanid lizard systematics. **Journal of Herpetology**, 29: 275-280. 1995.

CARPENTER, C.C.; MURPHY, J.B.; MITCHELL, L.A. Combat bouts with spur use in the Madagascan Boa (*Sanzinia madagascariensis*). **Herpetologica**, 34: 207-212. 1978.

CASTIGLIA, R.; BEZERRA, A.M.R.; FLORES-VILLELA, O.; ANNESI, F.; MUÑOZ, A.; GORNUNG, E. Comparative cytogenetics of two species of ground skinks: *Scincella assata* and *S. cherriei* (Squamata: Scincidae: Lygosominae) from Chiapas, Mexico. **Acta Herpetologica**, 8: 69-73. 2013.

CASTIGLIA, R.; ANNESI, F.; BEZERRA, A.M.R.; GARCÍA, A.; FLORES-VILLELA, O. Cytotaxonomy and DNA taxonomy of lizards (Squamata, Sauria) from a tropical dry forest in the Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve on the coast of Jalisco, Mexico. **Zootaxa**, 2508: 1-29. 2010.

CHEVALIER, M.; DUFAURE, J.P.; LECHER, P. Cytogenetic study of several species of *Lacerta* (Lacertidae, Reptilia) with particular reference to sex chromosomes. **Genetica**, 50: 11-18. 1979.

CIANCIARUSO, M.V.; BATALHA, M.A.; GASTON, K.J.; PETCHEY, O.L. Including intraspecific variability in functional diversity. **Ecology**, 90: 81-89. 2009.

COLLI, G.R.; FENKER, J.A.; TEDESCHI, L.G.; BATAUS, Y.S.L.; UHLIG, V.M.; LIMA, A.S.; ROCHA, C.F.D.; NOGUEIRA, C.C.; WERNECK, F.P.; MOURA, G.J.B.; WINCK, G.R.; KIEFER, M.C.; FREITAS, M.A.; RIBEIRO JÚNIOR, M.A.. HOOGMOED, M.S.; TINOCO, M.S.; VALADÃO, R.M.; VIEIRA, R.C.; MACIEL, R.P.; FARIA, R.G.; RECODER, R.; ÁVILA, R.W.; SILVA, S.T.; RIBEIRO, S.L.B.; AVILA-PIRES, T.C.S. **Avaliação do Risco de Extinção de *Ophiodes striatus* (Spix, 1824), no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. ICMBio.** <http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/carga-estado-de-conservacao/8773-repteis-ophiodes-striatus>. Downloaded on to February 2020. 2016.

CÓLUS, I.M.S.; FERRARI, I. Mitotic and meiotic chromosomes of *Mabuya* (Scincidae: Reptilia). **Genetica**, 77: 105-111. 1988.

COPE, E. D. On the hemipenis of the Sauria. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, 48: 461–467. 1896.

COSTA, H.C.; BÉRNILS, R.S. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista das espécies. **Herpetologia Brasileira**, 3: 75-93. 2018.

COZENDEY, P.; CAMPOS, S.P.S.; LANNA, F.M.; AMORIM, A.D.C.G.; SOUSA, B.M. *Ophiodes striatus* (Striped Worm Lizard): Bifurcated. **Herpetological Review**, 44: 145-146. 2013.

DEL CONTE, E.; TAMAYO, J.G. Ultrastructure of the sexual segments of the kidney in male and female lizards, *Cnemidophorus l. lemniscatus* (L.). **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, 144: 325-337. 1973.

ENTIUNASPE-NETO, O.M.; QUINTELA, F.M.; REGNET, R.A.; TEIXEIRA, V.H.; SILVEIRA, F.; LOEBMANN, D. A new and microendemic species of *Ophiodes* Wagler, 1828 (Sauria: Diploglossinae) from the Lagoa dos Patos Estuary, Southern Brazil. **Journal of Herpetology**, 51: 515-522. 2017.

EZAZ, T.; SARRE, S.D.; O'MEALLY, D.; MARSHALL GRAVES, J.A.; GEORGES, A. Sex chromosome evolution in lizards independent origins and rapid transitions. **Cytogenetic and Genome Research**, 127: 249-260. 2009.

FABRE, A-C.; COMETTE, R.; HUYGHE, K.; ANDRADE, D.V.; HERREL, A. Linear versus geometric morphometric approaches for the analysis of head shape dimorphism in lizards. **Journal of Morphology**, 275: 1016-1026. 2014.

FERREIRA, A.; SILVA, D.N.; VAN SLUYS, M.; DOLDER, H. Seasonal changes in testicular and epididymal histology of the tropical lizard, *Tropidurus itambere* (Rodrigues, 1987), during its reproductive cycle. **Brazilian Journal of Biology**, 69: 429-435. 2009.

FERREIRA, A.; DOLDER, H. Cytochemical study of spermatogenesis and mature spermatozoa in the lizard *Tropidurus itambere* (Reptilia, Squamata). **Acta Histochemica**, 105: 339-352. 2003.

FERREIRA, A.; LAURA, I.A.; DOLDER, H. Reproductive cycle of male green iguanas, *Iguana iguana* (Reptilia: Sauria: Iguanidae) in the Pantanal region of Brazil. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, 19, 23-28. 2002.

FLEMMING, A.F. Male and female reproductive cycles of the viviparous lizard *Mabuya capensis* (Sauria: Scincidae) from South Africa. **Journal of Herpetology**, 28: 334-341. 1994.

GALLARDO, J.M. Las especies argentinas del genero *Ophiodes* Wagler (Anguidae, Sauria). **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia e Instituto Nacional de Investigación de las Ciencias Naturales**, Zoología, tomo IX, n 6. 28 p. 1966.

GANS, C.; GASC, J.P. Test on the locomotion of the elongate and limbless reptile *Ophisaurus apodus* (Sauria: Anguidae). **Journal of Zoology**, 220: 517-536. 1990.

GANS, C. Terrestrial locomotion without limbs. **American Zoologist**, 2: 167-182. 1962.

GASC, J.P.; GANS, C. Test on locomotion of the elongate and limbless lizard *Anguis fragilis* (Squamata: Anguidae). **Copeia**, 1990: 1055-1067. 1990.

GIOVANNOTTI, M.; CAPUTO, V.; O'BRIEN, P.C.M.; LOVELL, F.L.; TRIFONOV, V.; NISI CERIONI, P.; OLMO, E.; FERGUSON-SMITH, M.A.; RENS, W. Skinks (Reptilia: Scincidae) have highly conserved karyotypes as revealed by chromosome painting. **Cytogenetic and Genome Research**, 127: 224-231. 2009.

GOMIDES, S.C.; RIBEIRO, L.B.; PETERS, V.M.; SOUSA, B.M. Feeding and reproduction ecology of the lizard *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae) in a rock outcrop area in southeastern Brazil. **Revista Chilena de Historia Natural**, 86: 137-151. 2013.

GRAY, J.A.; SHERRATT, E.; HUTCHINSON, M.N.; JONES, M.E.H. Evolution of cranial shape in a continental-scale evolutionary radiation of Australian lizards. **Evolution**, 1-14. doi:10.1111/evo.13. 2019.

GREER, A.E. Notes on the mode of reproduction in Anguid lizards. **Herpetologica**, 23, 94-99. 1967.

GREDLER, M.L.; LARKINS, C.E.; LEAL, F.; LEWIS, A.K.; HERRERA, A.M.; PERRITON, C.L.; SANGER, T.J.; COHN, M.J. Evolution of external genitalia: insights from reptilian development. **Sexual Development**, 8:311-326. 2014.

GRIBBINS, K.M.; GIST, D.H. Cytological evaluation of spermatogenesis within the germinal epithelium of the male European wall lizard, *Podarcis muralis*. **Journal of Morphology**, 258: 296-306. 2003.

GRIZANTE, M.B.; NAVAS, C.A.; GARLAND JR, T.; KOHLSDORF, T. Morphological evolution in Tropicodurinae squamates: an integrated view along a continuum of ecological settings. **Journal of Evolutionary Biology**, 23: 98-111. 2010.

GUALDRÓN-DURÁN, L.E.; CALVO-CASTELLANOS, M.F.; RAMÍREZ-PINILLA, P. Annual reproductive activity and morphology of the reproductive system of an Andean population of *Atractus* (Serpentes, Colubridae). **South American Journal of Herpetology**, 14: 58-70. 2019.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, São Paulo, 132p. 2002.

GUILLETTE, L.J. Morphology of the reproductive tract in a lizard exhibiting incipient viviparity (*Sphenornorphus fragilis*) and its implications for the evolution of the reptilian placenta. **Journal of Morphology**, 212: 163-173. 1992.

HALL, W.P. Chromosome variation, genomics, speciation and evolution in *Sceloporus* lizards. **Cytogenetic and Genome Research**, 127: 143-165. 2009.

HERNANDO, A.B. Caracterización cromosómica de *Ophiodes intermedius* (Sauria: Anguidae). **Facena**, 18: 31-34. ISSN 0325- 4216. 2002.

HERNANDO, A. B.; ALVAREZ, B. Estudios cromosómicos em saurios y anfisbénidos del litoral fluvial argentino y área de influencia. Estado del conocimiento. **Miscelánea**, 14: 427-440. 2005.

HERREL, A.; VANHOO, Y.; DONCK, B.; PORCK, J.; IRSCHICK, D.J. Anatomical basis of differences in locomotor behavior in *Anolis* lizards: a comparison between two ecomorphs. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, 159: 213-238. 2008.

HOHL, L.S.L.; LOGUERCIO, M.F.C.; SICURO, F.L.; BARROS-FILHO, J.D.; ROCHA-BARBOSA, O. Body and skull morphometric variations between two shovel-headed species of *Amphisbaenia* (Reptilia: Squamata) with morphofunctional inferences on burrowing. **PeerJ**, DOI 10.7717/peerj.3581. 2017.

HOHL, L.S.L.; LOGUERCIO, M.F.C.; BUENDÍA, R.A.; ALMEIDA-SANTOS, M.; VIANA, L.A.; BARROS-FILHO, J.D.; ROCHA-BARBOSA, O. Fossorial gait patterns and performance of a shovel-headed amphisbaenian. **Journal of Zoology**, 294: 234-240. 2014.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, 36: 1014-1015. 1980.

IRSCHICK, D.J.; GARLAND, T. Integrating function and ecology in studies of adaptation: investigations of locomotor capacity as a model system. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 32: 367-396. 2001.

IUCN. **The IUCN Red List of threatened species**. Version 2019-3. <https://www.iucnredlist.org>. Downloaded on to March 2021. 2021.

JAYNE, B.C. What defines different modes of snake locomotion? **Integrative and Comparative Biology**, 60: 156-170. 2020.

JOHNSON, M.A.; LOPEZ, M.V.; WHITTLE, T.K.; KIRCHER, B.K.; DILL, A.K.; VARGHESE, D.; WADE, J. The evolution of copulation frequency and the mechanisms of reproduction in male *Anolis* lizards. **Current Zoology**, 60: 768-777. 2014.

KALIONTZOPOULOU, A.; CARRETERO, M.A.; LLORENTE, G.A. Intraspecific ecomorphological variation: linear and geometric morphometrics reveal habitat-related patterns within *Podarcis bocagei* wall lizards. **Journal of Evolutionary Biology**, 23: 1234-1244. 2010.

KASPEROVICZUS, K.N.; SANTOS, L.C.; ALMEIDA-SANTOS, S.M. First report of hemiclitores in a female of the amphisbaenian *Amphisbaena microcephala*. **Herpetology Notes**, 4: 41-43. 2011.

KLACZKO, J.; GILMAN, C.A.; IRSCHICK, D.J. Hemipenis shape and hindlimb size are highly correlated in *Anolis* lizards. **Biological Journal of the Linnean Society**, 122: 627-634. 2017.

KOCH, A.; PHILIPP, K.; ZIEGLER, T. The monitor man: a story of stunning discoveries and charismatic creatures. **Biawak**, 4: 132-152. 2010.

KUKUSHKIN, O.V.; DOVGAL, I.V. Sexual dimorphism in *Pseudopus apodus* (Reptilia: Sauria: Anguinae) from the Steppe Crimea. **Ecologica Montenegrina**, 19: 1-21. 2018.

LEITÃO, M.D. Ovoviviparidade em *Ophiodes striatus* (Spix, 1824) – Sauria-Anguinae. **Iheringia**, 42: 34-39. 1973.

LJUBISAVLJEVIC, K.; UROSEVIC, A.; ALEKSIC, I.; IVANOVIC, A. Sexual dimorphism of skull shape in a lacertid lizard species (*Podarcis* spp., *Dalmatolacerta* sp., *Dinarolacerta* sp.) revealed by geometric morphometrics. **Zoology**, 113: 168-174. 2010.

LOPES, D.M.; TRAVENZOLI, N.M.; FERNANDES, A.; CAMPOS, L.A.O. Different levels of chromatin condensation in *Partamona chapadicola* and *Partamona nhambiquara* (Hymenoptera, Apidae). **Cytogenetic and Genome Research**, DOI: 10.1159/000507835.2020.

LOSOS, J.B. The evolution of form and function: morphology and locomotor performance in west indian *Anolis* lizards. **Evolution**, 44: 1189-1203. 1990.

LUCAS, P.S.; NOVELLI, I.A.; SOUSA, B.M. Assemblage of squamate reptiles in a natural remnant of Cerrado in southern Minas Gerais, Brazil. **Check List**, 12: 1866. 2016.

MACEDO, L.C.; BERNARDE, P.S.; ABE, A.S. Lagartos (Squamata, Lacertilia) em áreas de florestas e de pastagens em Espigão do Oeste, Rondônia, sudoeste da Amazônia, Brasil. **Biota Neotropica**, 8:133-139. 2008.

MACEY, J.R.; SCHULTE II, J.A.; LARSON, A.; TUNIYEV, B.S.; ORLOV, N.; PAPENFUSS, T.J. Molecular phylogenetics, tRNA evolution and historical biogeography in

anguid lizards and related taxonomic families. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 12: 250-272. 1999.

MARTÍNEZ-TORRES, M.; GUZMÁN-RODRIGUEZ, R.; CÁRDENAS-LEÓN, M.; BRUNNER-REYNALDO, N. Follicular development and ovulation determined by ultrasound imaging in the viviparous lizard *Barisia inbricata* (Reptilia: Anguidae). **The Southwestern Naturalist**, 51, 401-406. 2006.

MELO, G.C.; NASCIMENTO, L.B.; GALDINO, C.A.B. Lizard reproductive biology beyond the gonads: an investigation of sperm storage structures and renal sexual segments. **Zoology**, 135, 1-10. 2019.

MEZZASALMA, M.; GUARINO, F.M.; APREA, G.; PETRACCIOLI, A.; CROTTINI, A.; ODIERNA, G. Karyological evidence for diversification of Italian slow worm populations (Squamata, Anguidae). **Comparative Cytogenetics**, 7: 217-227. 2013.

MITTEROECKER, P.; GUNZ, P. Advances in geometric morphometrics. **Evolutionary Biology**, 36: 235-247. 2009.

MONTECHIARO, L.; KAEFER, I.L.; QUADROS, F.C.; CECHIN, S. Feeding habits and reproductive biology of the glass lizard *Ophiodes* cf. *striatus* from subtropical Brazil. **North-Western Journal of Zoology**, 7: 63-71. 2011.

MONTECHIARO, L.; ADAMS, G.B. *Ophiodes fragilis* (cobra-de-vidro): Cannibalism. **Herpetological Review**, 40: 89-90. 2009.

NASSAR, F.; SADEK, R.; HRAOUI-BLOQUET, S. Male reproductive seasonality of the snake-eyed lizard, *Ophisops elegans* Ménétriés, 1832, from Lebanon (Reptilia: Lacertidae). **Zoology in the Middle East**, 63: 17-23. 2017.

NEVES, S.M.N.; GUEDES, R.M.C. Hibridização *in situ* Fluorescente: Princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em Medicina Veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**, 79: 627-632. 2012

NOVELLI, I.A.; OLIVEIRA, P.R.; CASTAÑON, M.C.M.N.; SILVA, P.C.; SOUSA, B.M. Morphological and histological characterization of sexual segment of the kidney in *Notomabuya frenata* (Cope, 1862) and *Aspronema dorsivittatum* (Cope, 1862) (Squamata, Mabuyidae). **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, 90:2267-2278. 2018.

NOVELLI, I.A.; LUCAS, P.S.; CARVALHO, R.G.; SANTOS, R.C.; SOUSA, B.M. Lagartos em áreas de Cerrado na Reserva Biológica Unilavras-Boqueirão, Ingá, Sul de Minas Gerais, Brasil. **Biota Neotropica**, 12: 147-153. 2012.

NOVELLI, I.A.; LUCAS, O.S.; SANTOS, R.C. Reptilia, Squamata, Gymnophthalmidae, *Heterodactylus imbricatus* Spix, 1825: filling gaps in Minas Gerais state. **Check List**, 7: 30-31. 2011.

NIELSEN, S.V.; BANKS, J.L.; DIAZ, R.E.; TRAINOR, P.A.; GAMBLE, T. Dynamic sex chromosomes in Old World chameleons (Squamata: Chamaeleonidae). **Journal of Evolutionary Biology**, 31:484-490. 2018.

NUNES, P.M.S.; CURCIO, F.F.; ROSCITO, J.G.; RODRIGUES, M.T. Are hemipenial spines related to limb reduction? A spiny discusión focused on gymnophthalmid lizards (Squamata: Gymnophthalmidae). **The Anatomical Record**, 297: 482-495. 2014.

OLIVEIRA, P.R.; SANTOS, J.F.L.; SANTOS, J.A.D.; SOUSA, B.M. Morphological and biological variations of the glass snake *Ophiodes striatus* (Spix, 1825) (Squamata, Anguillidae) from southeastern Brazil. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, 93(1). 2021.

OLIVEIRA, P.R.; HUDSON, A.A.; HONÓRIO, N.R.; SOUSA, B.M. *Ophiodes striatus* (glass lizard): reproduction. **Herpetological Review**, 51: 130. 2020.

OLIVEIRA, M.; MARINHO, J.R.; FORNEL, R. Variação morfológica das escamas cefálicas em cobras-de-vidro no sul do Brasil. **Perspectiva Erechim**, 40: 43-51. 2016.

OLMO, E.; COBROR, O.; MORESCALCHI, A.; ODIERNA, G. Homomorphic sex chromosomes in the lacertid lizard *Takydromus sexlineatus*. **Heredity**, 53: 457-459. 1984.

OLSSON, M.; SHINE, R.; WAPSTRA, E.; UJVARI, B.; MADSEN, T. Sexual dimorphism in lizard body shape: the roles of sexual selection and fecundity selection. **Evolution**, 56: 1538-1542. 2002.

ORGAN, C.L.; MORENO, R.G.; EDWARDS, S.V. Three tiers of genome evolution in reptiles. **Integrative and Comparative Biology**, 48, 494-504. 2008.

ORTIZ, M.A.; BORETTO, J.M.; IBARGÜENGOYTÍA, N.R. How does a viviparous semifossorial lizard reproduce? *Ophiodes intermedius* (Squamata: Anguidae) from subtropical climate in the Wet Chaco region of Argentina. **Zoology**, 121: 35-43. 2017.

PAULL, D.; WILLIAMS, E.E.; HALL, W. Lizard karyotypes from the Galapagos Islands: chromosomes in phylogeny and evolution. **Museum of Comparative Zoology**, 441: 1-13. 1976.

PECCININI-SEALE, D. New developments in vertebrate cytotaxonomy IV: cytogenetic studies in reptiles. **Genetica**, 56: 123-148. 1981.

PIANKA, E.R.; VITT, L.J. Social behavior. p. 85-106. *In*: PIANKA, E.R.; VITT, L.J. **Lizards: windows to the evolution of diversity**. University of California Press, Ltd. Berkely and Los Angeles, California. 356p. 2003.

PIMENTA, M.A.; PEREIRA, K.D.L.; ROSA, G.M.V.; NASCIMENTO, A.T.C.; RIBEIRO M.V. Defensive behavior eventes of *Ophiodes striatus* (Reptilia: Squamata) during environmental study in state of São Paulo, Brazil. **Herpetological Notes**, 12: 1019-1021. 2019.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 83: 2934-2938.

PIZZATO, L. Reproductive biology of the “glass snake” *Ophiodes fragilis* (Squamata: Anguidae) in south-east Brazil. **Herpetological Journal**, 15: 9-13. 2005.

POKORNÁ, M.; GIAVANNOTTI, M.; KRATOCHIVÍL, L.; CAPUTO, V.; OLMO, E.; FERGUSON-SMITH, M.A.; RENS, W. Conservation of chromosomes syntenic with avian

autosomes in squamate reptiles revealed by comparative chromosome painting. **Chromosoma**, 121: 409-418. 2012.

PYRON, R.A. Novel approaches for phylogenetic inference from morphological data and total-evidence dating in Squamate reptiles (Lizards, Snakes and Amphisbaenians). **Systematic Biology**, 66: 38-56. 2017.

PYRON, R.A.; BURBINK, F.T.; WIENS, J.J. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. **Evolutionary Biology**, 2013: 13-93. 2013.

QUIPILDOR, M.; ABDALA, V.; FARFÁN, R.S.C.; LOBO, F. Evolution of the cloaca and genital musculature, and the genitalia morphology in liolemid lizards (Iguania: Liolaemidae) with remarks on their phylogenetic bearing. **Amphibia-Reptilia**, 39: 63-78. 2018.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Organizado por R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. Disponível em <https://www.R-project.org/>. 2021.

RAMÍREZ-BAUTISTA, A.; SITES JR, J.W.; MARSHALL, J.C.; CRUZ-ELIZALDE, R.; DÍAZ-MARÍN, C.A.; HERNÁNDEZ-SALINAS, U.; BERRIOZABAL-ISLAS, C.; GARCÍA-ROSALES, A. Reproduction and sexual dimorphism in the viviparous lizard *Sceloporus palaciosi* (Squamata: Phrynosomatidae) from the Trans-Mexican Volcanic Belt, Mexico. **Acta Zoologica**, DOI: 10.1111/azo.12315. 2019.

RAMÍREZ-BAUTISTA, A.; HERNÁNDEZ-SALINAS, U.; CRUZ-ELIZALDE, R.; LOZANO, A.; RODRÍGUEZ-ROMERO, J. Sexual dimorphism and reproductive traits over time in *Sceloporus aeneus* (Squamata: Phrynosomatidae), based on a population in the Transmexican Volcanic Belt, Mexico. **Salamandra**, 52: 197-203. 2016.

REJ, J.E.; MEAD, J.I. Geometric morphometric differentiation of two Western USA lizards (Phrynosomatidae: Squamata): *Uta stansburiana* and *Urosaurus ornatus*, with implications for fossil identification. **Bulletin of the Southern California Academy of Sciences**, 116: 153-161. 2017.

RHEUBERT, J.L.; SEVER, D.M.; SIEGEL, D.S.; TRAUTH, S.E. Male reproductive anatomy: the gonadoducts, sexual segment of the kidney and cloaca. *In*: RHEUBERT, J.L.; SIEGEL, D.S.; TRAUTH, S.E. (editors). **Reproductive biology and phylogeny of lizards and tuatara**. CRC Press: Taylor e Francis Group. p 253-301. 2015.

RHEUBERT, J.L.; TOUZINSKY, K.; SEVER, D.M.; ALDRIDGE, R.D.; WILMES, A.J.; SIEGEL, D.S.; GRIBBINS KM. Reproductive biology of *Sceloporus consobrinus* (Phrynosomatidae): male germ cell development and reproductive cycle comparisons within spiny lizards. **Journal of Herpetology**, 48:162-171. 2014.

RHEUBERT, J.L.; MURRAY, C.M.; SIEGEL, D.S.; BABIN, J.; SEVER, D.M. The sexual segment of *Hemidactylus turcicus* and the evolution of sexual segment location in Squamata. **Journal of Morphology**, 272: 802-813. 2011.

RIBEIRO, L.B.; SILVA, N.B.; FREIRE, L.M.X. Reproductive and fat body cycles of *Tropidurus hispidus* and *Tropidurus semitaeniatus* (Squamata, Tropiduridae) in a caatinga area of northeastern Brazil. **Revista Chilena de Historia Natural**, 85: 307-320. 2012.

ROCHA-BARBOSA, O.; LOGUERCIO, M.F.C.; VASCONCELLOS, F.M.; LINS, G.A.; NOVELLI, I.A.; HOHL, L.S.L. Capítulo 7: Reptilia. 142-173p. *In*: BENEDITO, E. (org.). **Biologia e Ecologia dos Vertebrados**. Editora Roca. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 259p. 2015.

ROCHA-BARBOSA, O.; MACHADO, C.; FERNANDES, L. Notas sobre a parturição da “cobra-de-vidro”, *Ophiodes striatus* (Spix, 1825) (Sauria, Anguidae). **Revista Brasileira de Biologia**, 51: 285-287. 1991.

ROHLF, F.J. **TPS Utility Program. Ver. 1.38**. Stony Brook, NY: Department of Ecology and Evolution, Universidade do Estado de Nova Iorque. 2006 a.

ROHLF, F.J. **TPSDig. Ver. 2.05**. Stony Brook, NY: Departament of Ecology and Evolution, Universidade do Estado de Nova Iorque. 2006 b.

RUANE, S. Using geometric morphometrics for integrative taxonomy: an examination of head shapes of milksnakes (genus *Lampropeltis*). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 174: 394-413. 2015.

SALLES, R.O.L.; SILVA-SOARES, T. Répteis do município de Duque de Caxias, Baixada Fluminense, Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil. **Biotemas**, 23: 135-144. 2010.

SATHE, E.A.; HUSAK, J.F. Sprint sensitivity and locomotor trade-offs in green anole (*Anolis carolinensis*) lizards. **The Journal of Experimental Biology**, 218: 2174-2179. 2015.

SAVIDGE, J.A.; SEIBERT, T.F.; KASTNER, M.; JAYNE, B.C. Lasso locomotion expands the climbing repertoire of snakes. **Current Biology**, 31: 1-8. 2021.

SCHMID, M. Chromosome Banding in Amphibia – II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. **Chromosoma**, 68: 131-148. 1978.

SEVER, D.M.; HOPKINS, W.A. Renal sexual segment of the ground skink, *Scincella laterale* (Reptilia, Squamata, Scincidae). **Journal of Morphology**, 266: 46-59. 2005.

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

SHINE, R.; BONNET, X. Reproductive biology, population viability, and options for field management. Pp. 172–200. *In*: MULLIN, S.J.; SEIGEL, R.A. (Eds.). **Snakes: Ecology and Conservation**. Cornell University Press, Ithaca. 2009.

SIDHOM, M.; SAID, K.; CHATTI, N.; GUARINI, F.M.; ODIERNA, G.; PETRACCIOLI, A.; PICARIELLO, O.; MEZZALMA, M. Karyological characterization of the common chameleon (*Chamaeleo chamaeleon*) provides insights on the evolution and diversification of sex chromosomes in Chamaeleonidae. **Zoology**, 141: 1-9. 2020.

SILVA, M.J.; VIEIRA, A.P.A.; CIPRIANO, F.M.G.; CÂNDIDO, M.R.S.; OLIVEIRA, E.H.C.; PINHEIRO, T.G.; SILVA, E.L. The karyotype of *Salvator merianae* (Squamata, Teiidae): analyses by classical and molecular cytogenetic techniques. **Cytogenetic and Genome Research**, DOI: 10.1159/000506140. 2020.

SILVA, P.C. **Estudo da relação entre aspectos morfológicos da língua de dezesseis espécies de lagartos ocorrentes no Brasil e seus respectivos tipos de forrageio**. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 89 p. 2019.

SILVA, D.; RODRIGUES, M.; MEHANNA, M.; FERREIRA, A.; DOLDER, H. Germinative cells and spermatogenesis of the lizard *Tropidurus torquatus* (Tropiduridae) from a urban área in the Cerrado biome of the Brazilian Midwest. **Bioscience Journal**, 32: 1595-1603. 2016.

SILVA, V.N.; ARAÚJO, A.F.B. Capítulo 5: Comportamento e Ecologia Reprodutiva. 81-106 p. *In*: SILVA, V.N.; ARAÚJO, A.F.B. (Orgs.). **Ecologia dos lagartos brasileiros**. Rio de Janeiro: Technical Books Editora. 271 p. 2008.

SILVEIRA, N.G.; NOVELLI, I.A.; FRÁGUAS, R.M. Emprego da técnica de diafanização para estudos osteológicos do lagarto semi-arborícola *Enyalius bilineatus* Duméril & Bilbron, 1837 (Sauria, Leosauridae). **Congresso Unificado UNILAVRAS**. VIII Seminário de Iniciação Científica – VII Seminário PIBIC/CNPQ and V Seminário PIBIC/FAPEMIG. II Fórum Científico do UNILAVRAS/2013. 2013.

SOUSA, B.M.; GOMIDES, S.C.; HUDSON, A.A.; RIBEIRO, L.B.; NOVELLI, I.A. Reptiles of the municipality of Juiz de Fora, Minas Gerais state, Brazil. **Biota Neotropica**, 12: 35-49. 2012.

SOUSA, B.; NASCIMENTO, A.E.R.; GOMIDES, S.C.; VARELA-RIOS, C.H.; HUDSON AH e NOVELLI IA. Répteis em fragmentos de Cerrado e Mata Atlântica do Campo das Vertentes, Estado de Minas Gerais, Sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, 10:129-138. 2010.

STRAHM, M.H.; SCHWARTZ, A. Osteoderms in the anguid lizard subfamily Diploglossinae and their taxonomic importance. **Biotropica**, 9: 58-72. 1977.

- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, 83:438-442. 1972.
- TELEMECO, R.S. Sex determination in Southern alligator lizards (*Elgaria multicarinata*; Anguillidae). **Herpetologica**, 71:8-11. 2015.
- TOLOSA, E.M.C.; RODRIGUES, C.J.; BEHMER, O.A.; NETO, A.G.F. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Editora Manole Ltda. 331 p. 2003.
- TRINDADE, I.T.; MORTON, G.F.; NOVELLI, I.A. *Ophiodes striatus*: minimum body mass for neonates. **Herpetological Review**, 44: 145. 2013.
- UETZ, P.; FREED, P.; HOSEK, J. **The Reptile Database**. <http://reptile-database.org/>, acesso em 13 de março de 2021. 2021.
- VALDECANTOS, S.; LOBO, F. First report of hemiclitores in females of South American liolaemid lizards. **Journal of Herpetology**, 49:291-294. 2015.
- VALVERDE, M.C.C.; SCHERER, P.O.; PINHEIRO, N.L. Características histológicas do segmento sexual do rim de três espécies de *Amphisbaenia* (Reptilia: Squamata). **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, 5:3-8. 2005.
- VITT, L.J.; CALDWELL, J.P. **Herpetology: An introductory biology of Amphibians and Reptiles**. 4ª Edição. Copyright – Elsevier, ISBN: 978-0-12-386919-7, 749 p. 2014.
- WEBSTER, T.P.; HALL, W.P.; WILLIAMS, E.E. Fission in the evolution of a lizard karyotype. **Science**, 177:611-613. 1972.
- ZAHER, H.; BARBO, F.E.; MARTINEZ, P.S.; NOGUEIRA, C.; RODRIGUES, M.T.; SAWAYA, R.J. Répteis do Estado de São Paulo: conhecimento atual e perspectiva. **Biota Neotropica**, 11: 1-15. 2011.
- ZAMORA-CAMACHO, F.J. Locomotor performance in a running toad: roles of morphology, sex and agrosystem versus natural habitat. **Biological Journal of the Linnean Society**, 123: 411-421. 2018.

ZYLBERBERG, L.; CASTANET, J. New data on the structure and the growth of the osteoderms in the reptile *Anguis fragilis* L. (Anguidae, Squamata). **Journal of Morphology**, 186: 327-342. 1985.

ANEXO I

Relação dos espécimes utilizados neste trabalho identificados como *Ophiodes cf. fragilis* coletados em municípios do estado de Minas Gerais, Brasil.

Coleção Herpetológica do Laboratório de Répteis da Universidade Federal de Juiz de Fora (CHUFJF-Répteis): Juiz de Fora – 28, 29, 35, 36, 52, 294, 309, 922, 961, 1866, 2115, 2116; Ritápolis – 205, 310, 456, 930, 931, 1473, 1641, 1642, 1643, 1644, 1645, 1646, 1647, 1648, 1649, 1650, 1651, 1652, 1653, 1868, 2000, 2070; Lavras – 1172, 1173, 1376, 1392, 1413; Ingai – 1395, 1405, 1406, 1415, 1430; São João del Rei – 1098, 1099; Tiradentes – 776, 777, 784; Chácara – 913, 914, 915, 916; Ijaci – 1443; Cristina – 1816.

Coleção de Répteis do Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa (MZUFV): Cataguases – 1369; Ervália – 768; Viçosa – 30.

ANEXO II

Tabela com os dados morfométricos, identificação sexual e número de depósito de *Ophiodes cf. fragilis* e *Ophiodes fragilis* pertencentes à Coleção Herpetológica do Laboratório de Répteis da Universidade Federal de Juiz de Fora (CHUFJF-Répteis) e à Coleção de Répteis do Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa (MZUFV). SVL – comprimento rostro-cloacal; HH – altura da cabeça; HW – largura da cabeça; DN – distância entre as narinas; LVL – comprimento do membro vestigial.

| Coleção | Espécie | Número de Depósito | Sexo | SVL | HH | HW | DN | LVL |
|----------------|-----------------------------|---------------------------|-------------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 29 | fêmea | 156,12 | 6,81 | 6,35 | 2,07 | 4,11 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 310 | macho | 143,96 | 6,23 | 7,48 | 2,36 | 3,72 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes fragilis</i> | 529 | fêmea | 165,99 | 5,79 | 6,82 | 2,38 | 7,98 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 922 | fêmea | 155,47 | 7,45 | 8,57 | 2,40 | 4,09 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 961 | fêmea | 155,36 | 8,00 | 7,54 | 2,26 | 4,07 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1173 | macho | 181,13 | 6,04 | 6,59 | 2,26 | 4,94 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1376 | macho | 178,77 | 5,24 | 6,56 | 1,98 | 4,88 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1392 | macho | 182,88 | 5,67 | 6,26 | 1,99 | 5,13 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1395 | macho | 153,11 | 6,46 | 7,34 | 1,87 | 3,04 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1405 | fêmea | 178,39 | 5,40 | 6,87 | 2,34 | 4,37 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1415 | macho | 121,35 | 5,08 | 5,02 | 2,11 | 2,92 |

| | | | | | | | | |
|--------|---------------------------------|------|-------|--------|------|------|------|------|
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1473 | fêmea | 138,91 | 5,61 | 6,53 | 2,04 | 3,29 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1641 | macho | 149,33 | 5,19 | 6,22 | 2,15 | 4,14 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1642 | macho | 151,61 | 5,11 | 7,35 | 2,81 | 3,58 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1643 | macho | 175,80 | 6,80 | 8,13 | 2,33 | 6,37 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1644 | fêmea | 160,92 | 5,52 | 6,39 | 1,82 | 3,73 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1645 | macho | 143,37 | 6,59 | 6,87 | 2,10 | 3,72 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1646 | fêmea | 185,09 | 6,22 | 6,88 | 2,67 | 4,63 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1647 | fêmea | 192,03 | 7,06 | 7,97 | 2,82 | 3,52 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1648 | macho | 161,42 | 5,96 | 7,60 | 2,13 | 4,29 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1649 | fêmea | 182,65 | 6,40 | 7,64 | 2,18 | 4,28 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1651 | fêmea | 161,65 | 5,72 | 7,04 | 2,34 | 4,94 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1652 | macho | 140,57 | 5,37 | 6,37 | 1,69 | 3,59 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1653 | macho | 143,96 | 5,15 | 6,39 | 1,69 | 4,04 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1737 | macho | 175,64 | 6,12 | 9,39 | 2,00 | 5,43 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1866 | macho | 180,80 | 7,45 | 8,59 | 3,10 | 5,24 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 2000 | fêmea | 200,32 | 7,39 | 7,90 | 3,00 | 4,42 |

| | | | | | | | | |
|--------|-----------------------------|------|-------|--------|------|------|------|------|
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 36 | fêmea | 158,57 | 7,51 | 5,84 | 2,74 | 4,12 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 28 | fêmea | 158,61 | 6,15 | 6,56 | 1,39 | 4,14 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 35 | macho | 160,04 | 6,3 | 6,83 | 2,42 | 4,28 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 52 | fêmea | 160,92 | 5,79 | 7,53 | 2,76 | 4,29 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 309 | fêmea | 161,31 | 4,2 | 5,45 | 1,94 | 4,37 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1099 | fêmea | 149,48 | 5,1 | 5,87 | 2,11 | 3,94 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1098 | macho | 151,27 | 5,52 | 6,59 | 2,06 | 4,00 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 205 | fêmea | 143,37 | 6,03 | 7,16 | 2,51 | 3,59 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 456 | macho | 147,64 | 6,76 | 9,16 | 2,91 | 3,76 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 784 | macho | 151,66 | 6,58 | 6,66 | 2,16 | 4,04 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 776 | macho | 153,11 | 6,78 | 7,64 | 2,39 | 4,04 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 777 | macho | 154,84 | 7,45 | 7,65 | 3,45 | 4,06 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 913 | fêmea | 163,8 | 5,1 | 6,61 | 2,00 | 4,56 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1443 | macho | 166,64 | 7,09 | 8,9 | 2,34 | 4,62 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1430 | macho | 175,8 | 5,56 | 7,04 | 2,24 | 4,81 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1406 | macho | 182,65 | 5,06 | 7,29 | 1,80 | 5,00 |

| | | | | | | | | |
|--------|-----------------------------|------|-------|--------|------|------|------|-------|
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1413 | macho | 187,11 | 4,86 | 7,29 | 2,66 | 5,45 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1108 | macho | 192,03 | 6,35 | 6,43 | 2,20 | 5,68 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 914 | macho | 196,18 | 6,05 | 7,44 | 2,55 | 5,76 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 915 | fêmea | 197,17 | 5,24 | 5,67 | 1,82 | 6,28 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 916 | macho | 217,21 | 5,52 | 7,72 | 2,78 | 6,37 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 2070 | macho | 150,77 | 6,27 | 7,23 | 2,45 | 4,91 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1868 | fêmea | 176,75 | 6,55 | 7,57 | 2,51 | 3,94 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 2116 | macho | 159,34 | 6,28 | 6,96 | 2,12 | 3,89 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 2115 | macho | 141,32 | 5,80 | 6,47 | 2,03 | 3,99 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1816 | macho | 212,03 | 6,70 | 8,11 | 2,50 | 4,43 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 930 | macho | 162,68 | 5,88 | 6,38 | 2,20 | 4,30 |
| CHUFJF | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 931 | macho | 151,80 | 6,11 | 7,57 | 2,00 | 4,90 |
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 229 | macho | 172,48 | 7,35 | 8,95 | 3,30 | 9,37 |
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 966 | fêmea | 162,87 | 6,66 | 7,40 | 2,71 | 7,37 |
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 28 | macho | 170,38 | 8,20 | 9,17 | 2,96 | 11,43 |
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 31 | fêmea | 180,93 | 7,37 | 8,70 | 2,94 | 9,09 |

| | | | | | | | | |
|-------|-----------------------------|------|-------|--------|------|------|------|-------|
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 763 | macho | 197,62 | 8,36 | 9,14 | 3,38 | 12,30 |
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 198 | macho | 92,74 | 5,03 | 4,74 | 1,73 | 3,18 |
| MZUFV | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 30 | macho | 164,10 | 6,90 | 7,60 | 2,47 | 4,33 |
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 481 | fêmea | 151,54 | 6,39 | 7,36 | 2,50 | 7,35 |
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 35 | macho | 161,60 | 6,75 | 7,81 | 2,92 | 10,63 |
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 27 | macho | 124,29 | 4,87 | 7,29 | 1,90 | 6,65 |
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 36 | macho | 136,96 | 6,87 | 7,03 | 1,85 | 8,65 |
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 331 | macho | 102,04 | 5,53 | 6,03 | 2,30 | 6,02 |
| MZUFV | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 1369 | fêmea | 187,49 | 7,81 | 8,42 | 2,91 | 8,76 |
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 1289 | macho | 206,79 | 8,12 | 9,77 | 3,13 | 13,68 |
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 1248 | fêmea | 185,41 | 7,04 | 8,24 | 2,92 | 8,65 |
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 1249 | fêmea | 189,84 | 7,40 | 8,06 | 2,44 | 9,20 |
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 1247 | fêmea | 155,63 | 6,80 | 7,69 | 2,84 | 10,59 |
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 862 | fêmea | 188,90 | 7,69 | 8,80 | 2,74 | 8,18 |
| MZUFV | <i>Ophiodes cf fragilis</i> | 768 | fêmea | 158,00 | 8,64 | 8,42 | 2,47 | 7,42 |
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 311 | fêmea | 133,66 | 4,89 | 6,35 | 1,92 | 3,55 |

| | | | | | | | | |
|-------|--------------------------|-----|-------|--------|------|------|------|------|
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 479 | fêmea | 178,09 | 8,72 | 9,12 | 3,00 | 9,49 |
| MZUFV | <i>Ophiodes fragilis</i> | 455 | fêmea | 222,69 | 8,35 | 8,70 | 3,06 | 8,67 |
