

UNIVERSIDADE DE MARÍLIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREAS: SAÚDE ANIMAL, PRODUÇÃO E AMBIENTE

ÁREA: Saúde Animal

CATEGORIA: Dissertação de Mestrado

COLHEITA DE SÊMEN POR MÉTODO NÃO INVASIVO DE CASCAVÉIS
(*Crotalus durissus terrificus*)

Suélem Lavorato de Oliveira

MARÍLIA - SP
2023

UNIVERSIDADE DE MARÍLIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM MEDICINA VETERINÁRIA

COLHEITA DE SÊMEN POR MÉTODO NÃO INVASIVO DE CASCAVÉIS
(*Crotalus durissus terrificus*)

Suélem Lavorato de Oliveira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isabela Bazzo da Costa

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Letícia Peternelli da Silva

Dissertação de Mestrado Profissional apresentada à Universidade de Marília – UNIMAR, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE em CIÊNCIAS – Área: Saúde Animal.

MARÍLIA - SP

2023

UNIVERSIDADE DE MARÍLIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM MEDICINA VETERINÁRIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

COLHEITA DE SÊMEN POR MÉTODO NÃO INVASIVO DE CASCAVÉIS
(*Crotalus durissus terrificus*)

Suélem Lavorato de Oliveira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isabela Bazzo da Costa

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Letícia Peternelli da Silva

Aprovado como parte das exigências para a obtenção do Título de MESTRE –
ÁREA SAÚDE ANIMAL pela Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Isabela Bazzo da Costa

Prof^a. Dr^a. Cláudia Sampaio Fonseca Repetti

Prof. Dr. Odair Francisco

Data da realização: 10 de agosto de 2023

Presidente da Comissão Examinadora
Prof^a. Dr^a. Isabela Bazzo da Costa

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SUÉLEM LAVORATO DE OLIVEIRA – nascida em 06 de julho de 1995, na cidade de Jacarezinho, Estado do Paraná, Brasil, é Médica Veterinária formada pelo Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos - UNIFIO, graduada em janeiro de 2018. Possui aprimoramento na área de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, no período de março de 2018 a fevereiro de 2020 pelo Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos - UNIFIO, possui pós-graduação em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais, no período de 2019 a 2021 pelo Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos - UNIFIO. Atua como Professora Universitária no Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos - UNIFIO, nas disciplinas de Morfofisiologia Veterinária, Técnica cirúrgica e Medicina de Animais Silvestres e Exóticos, desde março de 2020, e ainda, atua como médica veterinária na área de eletroquimioterapia em todas as espécies animais.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus e Nossa Senhora, por estarem sempre comigo, me abençoando, iluminando e guardando cada passo meu. Obrigada por me darem fé e forças para lutar e enfrentar todos os obstáculos.

Agradeço aos meus pais Roberto e Elza, que sempre estão ao meu lado me apoiando e ajudando em cada etapa da minha vida, sempre me estimulando nos momentos mais difíceis. Obrigada pelo amor de vocês.

Agradeço imensamente à minha orientadora Isabela Bazzo, que sempre não mede esforços em me ajudar, e sempre aceita o desafio que é me orientar. Sem você esse título não seria possível. Obrigada pela sua amizade e confiança.

Agradeço às minhas amigas Helo, Tai e Bia, que realmente considero como irmãs, e que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e torcendo por mim, independente da distância entre nós.

Agradeço aos meus colegas de Mestrado, em especial ao Otávio, compartilhando importante conhecimento comigo durante esse árduo percurso.

Agradeço a todos os professores do Programa de Mestrado Profissional da Unimar, por todo conhecimento compartilhado nesses dois anos. Um agradecimento em especial aos professores da banca de qualificação, Patrícia e Claudia, pelos conselhos, sugestões e interesse em contribuir para o desenvolvimento do projeto.

Por fim, o meu profundo e sentido agradecimento à todas as pessoas que contribuíram para a concretização dessa dissertação.

COLHEITA DE SÊMEN POR MÉTODO NÃO INVASIVO DE CASCAVÉIS (*Crotalus durissus terrificus*)

RESUMO

As principais ameaças de extinção das serpentes são a perda e a degradação do seu habitat natural, devido principalmente ao desmatamento, expansão urbana e queimadas. Uma das formas de conservação das serpentes pode ser através da colheita, análise e criopreservação do sêmen, a fim de trocar material genético entre criadores, estocagem do material biológico e formação de um banco de dados. Para a colheita, diversas técnicas foram descritas desde 1960, a mais antiga das técnicas consistia na compressão e massagem abdominal para a ejaculação, mas a contaminação da amostra por fezes e uratos era comum, mediante a isso as técnicas se aperfeiçoaram e em 2004 utilizou-se a solução anestésica de lidocaína 1% para o relaxamento e acesso direto a papila genital para a redução da contaminação. Com isso, o objetivo do trabalho foi resgatar a técnica utilizada em 1980, que consistia na massagem abdominal e colheita de sêmen com o auxílio de uma seringa. Para o estudo foram utilizadas 5 serpentes da espécie *Crotallus durissus terrificus* (cascavel), proveniente da APASS, na cidade de Assis, estado de São Paulo. Os resultados obtidos foram uma média de volume seminal de 300 uL, com a motilidade espermática de 68%, motilidade progressiva: 3, patologias espermáticas: 1, concentração espermática: $1,4 \times 10^9$ spz/mL. Com isso, conclui-se que o método de colheita não invasivo por meio de massagem abdominal ainda se mostra eficaz.

Palavras-chave: Conservação, Reprodução, Serpentes.

NON-INVASIVE SEMEN COLLECTION FROM RATTLESNAKES (*Crotalus durissus terrificus*)

ABSTRACT

The main threats of extinction of snakes are the loss and degradation of their natural habitat, mainly due to deforestation, urban expansion and fires. One way of conserving snakes can be through the collection, analysis and cryopreservation of semen, in order to exchange genetic material between breeders, storage of biological material and formation of a database. For the collection, several techniques have been described since 1960, the oldest of the techniques consisted of abdominal compression and massage for ejaculation, but contamination of the sample by feces and urates was common, through which the techniques were perfected and in 2004 they were used. 1% lidocaine anesthetic solution for relaxation and direct access to the genital papilla to reduce contamination. With this, the objective of the work was to rescue the technique used in 1980, which consisted of abdominal massage and semen collection with the aid of a syringe. For the study, 5 snakes of the species *Crotallus durissus terrificus* (rattlesnake), from APASS, in the city of Assis, state of São Paulo, were used. The results obtained were an average seminal volume of 300 μ L, with sperm motility of 68%, progressive motility: 3, sperm pathologies: 1, sperm concentration: 1.4×10^9 spz/mL. Thus, it is concluded that the non-invasive collection method through abdominal massage is still effective.

Keywords: Conservation, Reproduction, Snakes.

Certificado de Aprovação do Comitê de Ética de Uso Animal - CEUA

CERTIFICADO CIAEP-01.0218.2014

Certificamos que o projeto intitulado “**Coleta e avaliação seminal de cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*)**” (Protocolo 24/2022), sob a responsabilidade da Prof. Dra. Isabela Bazzo da Costa, que envolve produção, manutenção e /ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **Aprovado** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL (CEUA) DA UNIVERSIDADE DE MARÍLIA.

Vigência do projeto	01/12/2022 a 31/08/2023
Espécie/linhagem	Cascavel (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)
Número de animais	10
Peso / Idade	1 a 1,5kg/ 3 a 5 anos
Sexo	Machos

Marília, 10 de Novembro de 2022,

Profa. Dra. Cláudia Sampaio Fonseca Repetti

Coordenadora do CEUA

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Características externa da serpente *Crotallus durissus terrificus*.....16
- Figura 2-** Macho de *Xenodon* sp. ilustrando todo o trato urogenital (A). Em detalhe observa-se os testículos (B) e ductos deferentes enovelados (C). Barra de escala = 1 cm.....17
- Figura 3-** Hemipênis de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) evertido.....18
- Figura 4-** Sexagem. A: Em fêmeas, a sonda entra de duas a quatro escamas subcaudais; B: Em machos, a sonda entra de 8 a 12 escamas subcaudais.....19
- Figura 5-** Morfologia normal do espermatozóide de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) corado através da coloração simples de acrossoma.....22
- Figura 6-** Espermatozóide (seta branca) em meio a restos celulares, bactérias, protozoários e urato. Fotomicrografia de amostra de sêmen de *Crotalus ruber ruber* ao exame sob microscópio de luz e contraste de fase (objetiva 40X).....22
- Figura 7-** Fotomicrografias de amostras de sêmen de *Crotalus ruber ruber* coradas com coloração Eosina/Nigrosina para avaliação de integridade de membrana espermática. A) Amostra de sêmen diluída em Test-gema e apresentando padrão normal de coloração. Espermatozóide com membrana íntegra (nº1) e alterada (nº2) B) Amostra de sêmen diluída em Test-gema com glicerol antes da congelação, apresentando padrões anormais de coloração C) Amostra de sêmen diluída em Test-gema com glicerol após a congelação, apresentando padrões anormais de coloração.....23
- Figura 8-** Posturas características durante o combate ritual. Família Colubridae – *Drymarchon corais* (A); Família Elapidae - *Micrurus frontalis* (B); Família Elapidae - *Bungarus fasciatus* (C); Família Elapidae - *Ophiophagus hannah* (D); Família Viperidae - *Crotalus durissus* (E); Família Colubridae - *Chironius bicarinatus* (F).....25
- Figura 9-** Alinhamento do macho sobre o dorso da fêmea, *Crotallus durissus terrificus*.....26

- Figura 10:** Elementos figurados do sêmen. A – Patologias de acrossomo. B – Patologias de cabeça. C- Patologias de inserção de cauda. D – Patologia de peça intermediária. E – Patologias de cauda. F – Formas teratológicas.....30
- Figura 11-** Massagem ventral para colheita de sêmen em cascavel (*Crotalus durissus terrificus*). A seta indica o sentido da massagem.....31
- Figura 12-** Colheita de sêmen em cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) a partir da papila genital localizada na cloaca.....32
- Figura 13-** Espermatozóide de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) sob microscopia de luz com interferência de fase (Olympus BX 50) e aumento da objetiva de 100 vezes. A – Espermatozóide normal. A seta aponta o fim da peça intermediária. (As setas nas fotos a seguir apontam as alterações morfológicas descritas) B – Acrossoma dobrado. C – Gota citoplasmática proximal. D – Gota citoplasmática distal. E – Peça intermediária enrolada. F – Peça intermediária dobrada. G – Forma teratológica. H – Cauda fortemente dobrada.....34

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Valores obtidos após realização das avaliações seminais de todos os animais, quanto ao volume, cor e odor de sêmen, vigor, concentração espermática, motilidade espermática, motilidade espermática progressiva e presença de patologias espermáticas.....	40
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Conservação das serpentes.....	15
2.2. Biologia.....	15
2.3. Anatomia Reprodutiva.....	16
2.4. Biologia Reprodutiva.....	19
2.4.1. Aquisição de energia.....	19
2.4.2. Ciclos Hormonais.....	20
2.4.3. Espermatogênese e morfologia espermática.....	21
2.4.4. Características sexuais secundárias.....	24
2.4.5. Dança combate.....	24
2.4.6. Corte e cópula.....	25
2.4.7. Estocagem de espermatozóides.....	26
2.5. Biotecnologia da reprodução.....	27
2.5.1. Exame andrológico.....	28
2.5.1.1. Avaliação espermática.....	28
2.5.1.1.1. Volume, cor, densidade e odor do ejaculado.....	28
2.5.1.1.2. Concentração e motilidade dos espermatozóides.....	29
2.5.1.1.3. Morfologia, vitalidade e vigor dos espermatozóides.....	29
2.5.1.1.4. Patologias espermáticas.....	29
2.6. Biotecnologia da reprodução em serpentes.....	31
2.6.1. Colheita de sêmen.....	31
2.6.2. Avaliação macroscópica e microscópica.....	33
2.6.3. Criopreservação.....	35
2.6.4. Inseminação artificial.....	36
3. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS.....	37
3.1. Objetivo geral.....	37
3.2. Objetivos específicos.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1. Aprovação do Comitê de Ética de Uso Animal – CEUA.....	38
4.2. Animais.....	38

4.3. Colheita de sêmen.....	38
4.4. Avaliação seminal.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

As serpentes pertencem à Ordem Squamata e a Subordem Serpentes podendo ainda ser divididas em dois grupos, as peçonhentas e as não peçonhentas (GREGO, ALBUQUERQUE, KOLESNIKOVAS, 2014). São encontradas em quase todas as partes do planeta, mas principalmente em regiões tropicais e temperadas, explicada por serem seres ectotérmicos, ou seja, dependentes da temperatura externa para manter suas características fisiológicas, podendo ocupar todos os ambientes, como os aquáticos, arboríferos e terrestres (ANDRADE, PINTO, OLIVEIRA, 2002; GREGO, ALBUQUERQUE, KOLESNIKOVAS, 2014).

A anatomia reprodutiva dos machos das serpentes é composta de dois testículos dispostos assimetricamente, sendo o direito maior e mais cranial quando comparado com o esquerdo. São massas ovoides, alongadas e cilíndricas, localizadas na cavidade celomática caudalmente aos rins. Os mesmos são ligados à base do hemipênis, órgão copulador, pelos ductos deferentes (ZACARIOTTI, 2004; PIZZATO, ALMEIDA-SANTOS, MARQUES, 2006a; ZACARIOTTI, 2008; MATAYOSHI, 2011; ALMEIDA-SANTOS, 2014).

O ciclo reprodutivo do macho é composto basicamente na aquisição de energia, espermatogênese, produção de características sexuais secundárias, busca por cópulas, dança combate, corte e cópulas (ZACARIOTTI, 2008). Neles a aquisição de energia é dada pela alimentação e com isso a estocagem de gordura abdominal, durante o verão (SUEIRO, 2013).

Como citado por Zacariotti e Guimarães (2010), a espermatogênese das serpentes pode estar relacionada à temperatura e não à sazonalidade. O mesmo autor supracitado ainda menciona que a mesma acontece em cinco estágios, sendo que o primeiro é caracterizado pela presença de espermatogônias e espermatócitos primários, no segundo aparecem os primeiros espermatozóides na luz dos túbulos seminíferos, o terceiro tem grande presença de espermatozóides e redução do número de espermatócitos e espermátides, no quarto estágio há presença de apenas espermatogônias e espermatócitos primários e diminuição de espermatozóides e no último estágio contamos com a ausência de espermatozóides.

As características sexuais secundárias ocorrem nos machos simultaneamente à gametogênese, por estímulos do segmento sexual do rim (ZACARIOTTI, 2004; ALMEIDA-SANTOS, 2014; SUEIRO, 2013). Já a dança combate é caracterizada por um ritual dos machos, através de movimentos corporais em que o vencedor tem a prioridade sobre a fêmea (PIZZATO, MANFIO, ALMEIDA-SANTOS, 2006b; SAWAYA, MARQUES, MARTINS, 2008). A corte desses animais ocorre em três etapas, onde a primeira é denominada perseguição tátil, a segunda alinhamento do macho com relação a fêmea e a terceira é a cópula (PIZZATO, MANFIO, ALMEIDA-SANTOS, 2006b).

As serpentes apresentam uma particularidade, que é a estocagem de espermatozoides, que pode ocorrer tanto na fêmea quanto no macho. Nas fêmeas a estocagem ocorre no oviduto, enquanto nos machos ocorre na região distal dos ductos deferentes (JANEIRO-CINQUINI, 2004; ALMEIDA-SANTOS, 2005; ZACARIOTTI, 2008; BARROS, SUEIRO, ALMEIDA-SANTOS, 2012; BASSI, 2016).

As técnicas de reprodução assistida são ferramentas que proporcionam programas para a conservação das espécies (SALVADOR, TRILLO, MARCORRO, 2016). Para isso, vários métodos de colheita de sêmen foram testados, como a massagem no sentido crânio-caudal ou pressão com a mão do terço final do corpo do animal, mas nesse caso foi comum a contaminação da amostra com fezes e cristais de urato (ZACARIOTTI, GUIMARÃES, 2010). Com a utilização do eletroejaculador para a colheita também pode-se observar a mesma contaminação, também pode ser realizada a eutanásia do animal para a coleta do sêmen. Já com a aplicação de anestésico local, lidocaína ao redor da cloaca como mostrada por Zacariotti (2004), houve uma redução da contaminação antes observada.

O objetivo deste trabalho foi instituir a colheita de sêmen em cascavéis pelo método não invasivo, com massagens abdominais, bem como avaliar macroscopicamente e microscopicamente o sêmen, observando volume, cor, odor, motilidade espermática, motilidade progressiva, vigor, patologias espermáticas e concentração espermática.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conservação das serpentes

As serpentes são animais que auxiliam no equilíbrio ecológico, contribuindo para o controle populacional de insetos e roedores, além de fazer parte da cadeia alimentar de aves de rapina e demais predadores. No entanto, atualmente muitas espécies de serpentes estão ameaçadas de extinção devido à destruição do seu habitat, pelo desmatamento, caça e comércio ilegal e outras atividades humanas (MELAZO, 2005; FREITAS et al., 2020).

Outro ponto importante para a conservação das serpentes, principalmente das peçonhentas é que o seu veneno é utilizado na medicina, para a fabricação de medicamentos. O veneno contém uma série de compostos biologicamente ativos, como enzimas, proteínas e peptídeos, que podem ter efeitos terapêuticos (BERNARDE, 2014).

2.2 Biologia

Cientificamente, as cascavéis são chamadas de *Crotalus durissus terrificus*. Pertencentes ao reino Animalia, classe Reptilia, ordem Squamata, subordem serpentes, família Viperidae, gênero *Crotalus*. São de ampla distribuição no território brasileiro, principalmente na região do cerrado, seus hábitos são terrícolas, de preferência em campos abertos, regiões secas e pedregosas. Com hábitos noturnos e crepusculares (COSTA, MOURA, FEIO, 2008).

Tem-se como característica principal a presença do guizo na ponta da cauda. Coloração marrom-amarelada, apresentando desenhos na forma de losangos, mais claros no dorso e laterais. Com presença de fosseta loreal, órgão termorregulador, conectado diretamente com o encéfalo, encontrado entre a região dos olhos e narinas, tem a função de auxiliar na captura de animais endodérmicos (Figura 1) (FRAGA, 2013). Sua dentição é o tipo solenóglifa, onde há a presença de dois dentes inoculadores de peçonha, sendo os mesmos caniculados, móveis e compridos, com posicionamento anterior da maxila (GREGO, ALBUQUERQUE, KOLESNIKOVAS, 2014).

Figura 1: Características externas da serpente *Crotallus durissus terrificus*.



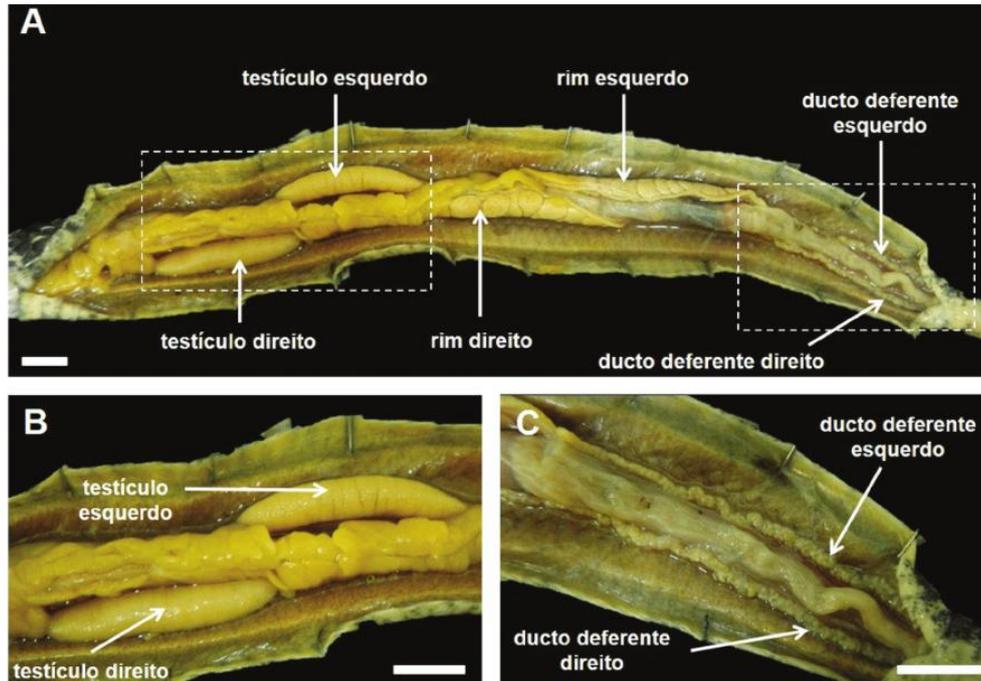
Fonte: Lima, 2010.

O ciclo reprodutivo dos machos ocorre ao longo de todo o ano, para as fêmeas a estação reprodutiva ocorre de agosto a novembro, período que coincide com o final da estação seca e início da estação chuvosa. As fêmeas são consideradas vivíparas, ou seja, animais cujo desenvolvimento embrionário ocorre dentro do corpo materno, com placenta que fornece os nutrientes necessários para os filhotes. A gestação é de quatro meses e a postura é em média de 25 filhotes, durante o verão (GREGO, ALBUQUERQUE, KOLESNIKOVAS, 2014).

2.3 Anatomia Reprodutiva

Os órgãos reprodutivos masculinos são pareados e assimétricos, sendo que o direito é posicionado mais cranialmente que o esquerdo, são alongados, cilíndricos e localizados intra-abdominais. O posicionamento anatômico na cavidade celomática é entre os órgãos, baço, pâncreas e vesícula biliar, compondo assim a tríade pancreática, e os rins. São compostos por túbulos seminíferos, células intersticiais e vasos sanguíneos, envolvidos por tecido conjuntivo e túnica vaginal (Figura 2) (ZACARIOTTI, 2004; PIZZATO, ALMEIDA-SANTOS, MARQUES, 2006a; ZACARIOTTI, 2008; ALMEIDA et al., 2010; MATAYOSHI, 2011).

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



Fonte: Henrique B. Braz, 2014.

A comunicação dos testículos com a cloaca ocorre pelos ductos deferentes, enovelados em machos ativos e lisos em machos imaturos, terminando em papilas genitais, na base do pênis, via comum entre os sistemas urinário e genital. Os répteis não apresentam uretra peniana (ZACARIOTTI, 2008; MATAYOSHI, 2011).

Nos testículos são encontrados os ductos deferentes, orientando-se para o epidídimo, que diferentemente dos mamíferos, não apresentam divisão em cabeça, corpo e cauda, com íntima ligação nos testículos (ALMEIDA-SANTOS, 2005). No final do ducto deferente se encontra a região ampolar, que nos répteis, mas especificamente nas serpentes, tem a função de armazenar os espermatozoides (ALMEIDA-SANTOS, 2014).

Nos ofídios e saurias, o órgão copulatório é pareado, denominado de hemipênis, sua localização é no interior da cauda, desde que não esteja ocorrendo a cópula (ZACARIOTTI, 2008). Em todas as serpentes durante a cópula somente um dos hemipênis é introduzido (ZACARIOTTI, GUIMARÃES, 2010). De característica esponjosa, se enche de sangue e linfa no momento da ereção, com pequenas diferenciações entre as espécies, podendo ter espinhos, macro e micro ornamentações (ANDRADE, PINTO, OLIVEIRA,

2002). No caso das cascavéis, o hemipênis é bilobado e com estruturas que auxiliam na fixação no momento da cópula, como por exemplo ganchos e papilas (Figura 3) (ZACARIOTTI, 2004).

Figura 3: Hemipênis de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) evertido.



Fonte: ZACARIOTTI, 2004.

De difícil diferenciação entre machos e fêmeas, a sexagem é realizada por meio da introdução de sonda metálica roma e lubrificada na região cloacal. Se for um macho, a esta sonda percorre cerca de 12 escamas subcaudais e no caso de fêmeas apenas quatro escamas (Figura 4) (GREGO, ALBUQUERQUE, KOLESNIKOVAS, 2014). Em algumas espécies o dimorfismo pode ser observado sobre a diferença no tamanho da cauda, os machos apresentam cauda maior do que a das fêmeas (PIZZATO, ALMEIDA-SANTOS, MARQUES, 2006a).

Figura 4: Sexagem. A: Em fêmeas, a sonda entra de duas a quatro escamas subcaudais; B: Em machos, a sonda entra de 8 a 12 escamas subcaudais.



Fonte: GREGO, UQUERQUE, KOLESNIKOVAS, 2014.

2.4 Biologia Reprodutiva

São animais sensíveis às variações ambientais, devido a características de serem ectodérmicos, que é a variação da temperatura corporal devido a alteração da temperatura ambiental, alterando assim a condição ecofisiológica do mesmo. Há outras mudanças que interferem na condição de vida dos répteis, como fotoperíodo, estações do ano, disponibilidade de alimento e modo de se reproduzir (PRADO, 2006; BASSI, 2016).

O ciclo reprodutivo das serpentes se dá por aquisição de energia, espermatogênese, produção de características sexuais secundárias, busca por cópulas, dança-combate, corte e cópula (ZACARIOTTI, 2008).

2.4.1 Aquisição de energia

As serpentes são consideradas animais *capital breeders*, ou seja, não se reproduzem até estocar a quantidade necessária de energia, assim ocorre a separação do tempo para a aquisição de energia e o período reprodutivo (SUEIRO, 2013).

Nos machos o estoque de energia ocorre na forma de gordura abdominal através da alimentação, antes da gametogênese, coincidindo com a estação climática do verão. Há também uma segunda possibilidade de acúmulo

de energia, que ocorre com o aumento significativo da massa relativa dos rins e concentração de lipídios renais, assim os índices lipossomáticos, hepatossomáticos e renalsomáticos são parâmetros precisos para a mobilização de substratos energéticos (PIZZATO, ALMEIDA-SANTOS, MARQUES, 2006; SUEIRO, 2013).

O consumo de energia ocorre através da procura por fêmeas e dança combate, chegando a valores mínimos no final da estação reprodutiva (ZACARIOTTI, 2008). Os custos energéticos são divididos basicamente em duas categorias, os ligados a sobrevivência, que influenciam na sobrevivência dos animais, e os ligados a fecundidade, que influencia a energia disponível para a reprodução (SUEIRO, 2013).

2.4.2 Ciclos hormonais

Assim como nos animais mamíferos, as atividades reprodutivas são controladas pelo sistema neuroendócrino, através do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. O hipotálamo faz a liberação do GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas) em resposta aos estímulos ambientais, como por exemplo o fotoperíodo, associado ao aumento da demanda de alimento e ao aumento da temperatura. Após o estímulo do hipotálamo, a adeno-hipófise libera o FSH (Hormônio folículo-estimulante), no caso das serpentes e lagartos ocorre a liberação do FSH-*like*, mediante a esses eventos ocorre a estimulação dos testículos para que ocorra a espermatogênese (MATAYOSHI, 2011).

No caso das serpentes, a corte e a cópula não são dependentes do aumento dos níveis de testosterona, já que foi visto que o hormônio pode se encontrar elevado em períodos reprodutivos e não reprodutivos (ALMEIDA-SANTOS, 2005). Há autores que relatam que algumas espécies de cascavéis, apresentam aumento da testosterona durante o comportamento reprodutivo, pelos basófilos encontrados na adeno-hipófise (SALOMÃO, ALMEIDA-SANTOS, 2002), mas é durante o final do verão e outono, que a espermiogênese ocorre, associado ao outono também há o pico de espermatogênese, enquanto no período de inverno tem-se a regressão testicular e a inatividade do órgão reprodutivo, assim menor concentração de

testosterona (ZACARIOTTI, GUIMARÃES, 2010; BARROS, SUEIRO, ALMEIDA-SANTOS, 2012).

Vários ciclos reprodutivos são descritos pelos autores, no caso de Almeida & Santos (2005), os ciclos são divididos em pré-nupcial e pós-nupcial, onde o primeiro é quando a produção de gametas precede ou coincide com a época de acasalamento, sendo que o segundo a produção de gametas ocorre após a época de acasalamento, assim os machos precisam armazenar os espermatozoides, e isso ocorre nos ductos deferentes. Para Bassi (2016), os ciclos reprodutivos são descritos como misto e acíclico, sendo que no misto ocorre a produção de espermatozoides no final da primavera e a interrupção durante o inverno, já no acíclico ocorre a produção dos espermatozoides durante o ano todo, sendo um processo constante.

Mathies (2011) dividiu os ciclos individualmente, separando-os em descontínuo cíclico, contínuo cíclico e acíclico, e populacional. No descontínuo cíclico ocorre a retração total das gônadas em determinada estação do ano, já no contínuo cíclico tem-se a redução na produção de gametas, e o acíclico tem a produção contínua dos gametas. Duas divisões podem ser empregadas ainda no populacional, o sincrônico ou asazonal, que apresenta sincronia ou não sincronia entre os indivíduos, respectivamente.

2.4.3 Espermatogênese e morfologia espermática

A espermatogênese em serpentes é dividida em cinco estágios, o primeiro ocorre nos túbulos seminíferos onde é encontrado alto número de espermatogônias e espermátocitos primários, no segundo há o aparecimento dos primeiros espermatozoides, já no terceiro estágio há a presença de um grande número de espermatozoides nos túbulos seminíferos, com redução dos espermátocitos secundários e espermátides. No quarto estágio tem-se a redução dos espermatozoides e conseqüentemente o aumento das espermatogônias e espermátocitos primários, por último não é possível a identificação da presença de espermatozoides, somente espermatogônias e espermátocitos primários (ZACARIOTTI, 2004).

Os espermatozoides dos squamatas são afilados, com acrossoma em formato de cone e com cabeça alongada. A peça intermediária é longa, com

presença de corpos densos, que são possíveis transformações mitocondriais e presença de centríolos proximal e distal (Figura 5, 6 e 7) (ZACARIOTTI, GUIMARÃES, 2010).

Figura 5: Morfologia normal do espermatozóide de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) corado através da coloração simples de acrossoma.



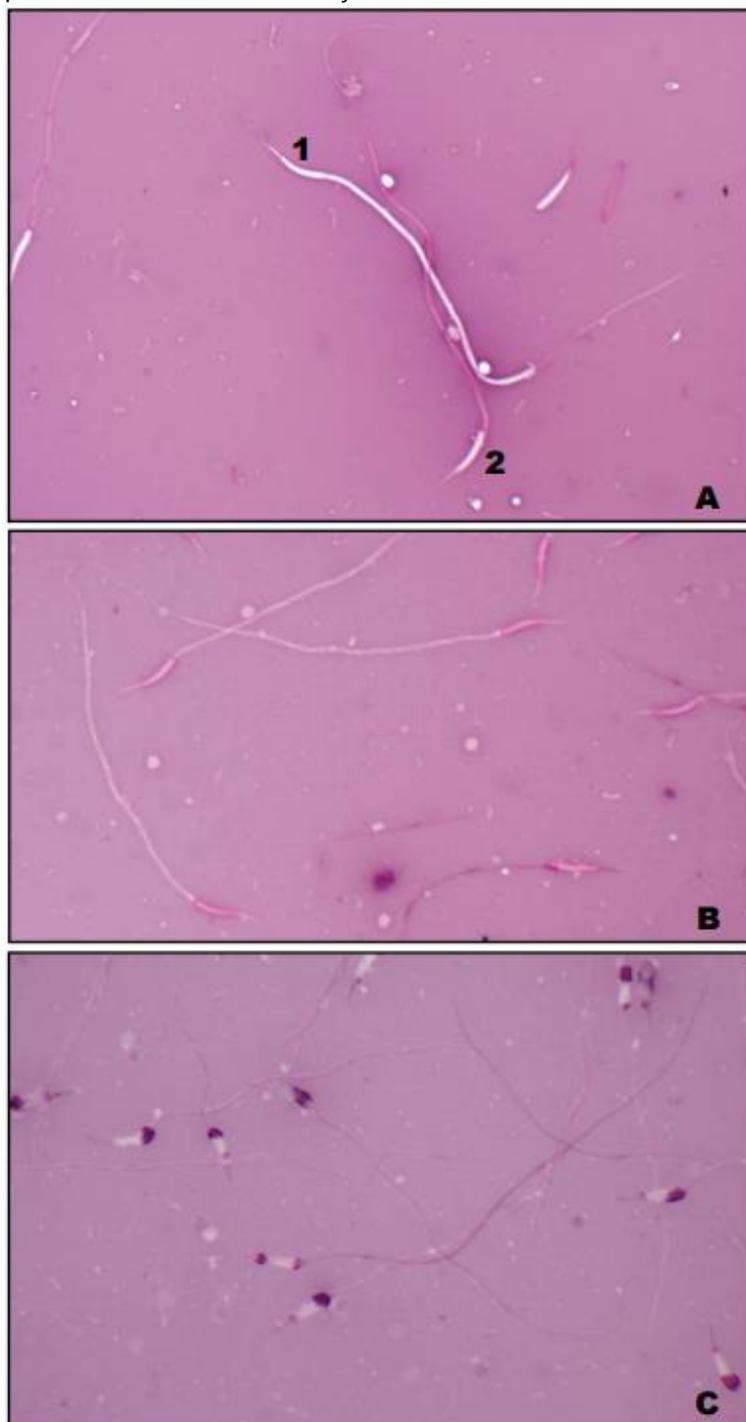
Fonte: ZACARIOTTI, 2004.

Figura 6: Espermatozóide (seta branca) em meio a restos celulares, bactérias, protozoários e urato. Fotomicrografia de amostra de sêmen de *Crotalus ruber ruber* ao exame sob microscópio de luz e contraste de fase (objetiva 40X).



Fonte: ZACARIOTTI, 2008.

Figura 7: Fotomicrografias de amostras de sêmen de *Crotalus ruber ruber* coradas com coloração Eosina/Nigrosina para avaliação de integridade de membrana espermática. A) Amostra de sêmen diluída em Test-gema e apresentando padrão normal de coloração. Espermatozóide com membrana íntegra (n°1) e alterada (n°2) B) Amostra de sêmen diluída em Test-gema com glicerol antes da congelação, apresentando padrões anormais de coloração C) Amostra de sêmen diluída em Test-gema com glicerol após a congelação, apresentando padrões anormais de coloração.



Fonte: ZACARIOTTI, 2008.

2.4.4 Características sexuais secundárias

Identificadas nos machos, no período da gametogênese. Nos rins as serpentes apresentam uma região denominada segmento sexual renal, ou SSR, que são regiões do túbulo contorcido distal, ducto coletor e ureter, que são estimulados pelas altas concentrações de hormônios esteroides, como a testosterona. Produz grânulos de secreção eosinofílica, com a função de secretar substâncias para a manutenção de espermatozóides viáveis, durante o período não reprodutivo, como o outono, a fim de estocar os mesmos até a nova fase reprodutiva (ZACARIOTTI, 2004).

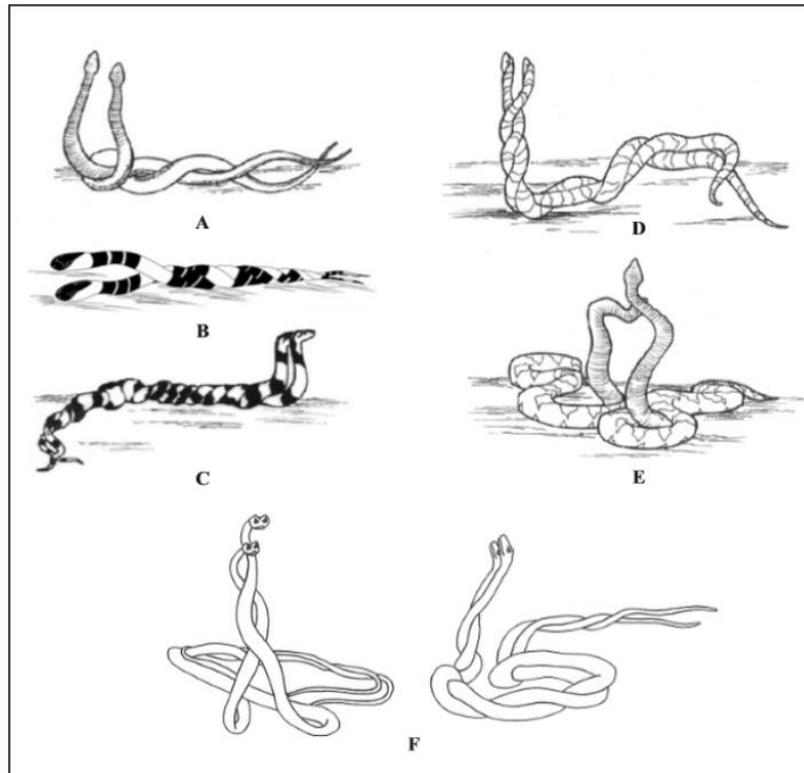
Diferentemente dos machos, as fêmeas não apresentam a região do segmento sexual renal e nem a variação da histologia renal ao longo do ano (SUEIRO, 2013; ALMEIDA-SANTOS, 2014).

2.4.5 Dança combate

Caracterizada por movimentos corporais, como empurrões, prendendo ou entrelaçando o adversário, sem agressão, somente com demonstração de sua força. Esse ritual, ocorre durante o período de acasalamento, onde o macho vencedor tem prioridade sobre a fêmea. Ocorre principalmente nas espécies que não são constritoras e/ou que não envenenam suas presas (PIZZATO, MANFIO, ALMEIDA-SANTOS, 2006; SAWAYA, MARQUES, MARTINS, 2008).

Quatro padrões de combate são descritos na literatura, os colubrídeos entrelaçam quase que a totalidade do corpo, com suas cabeças próximas e pouco acima dos solos. Já nos elapídeos, os corpos são entrelaçados, mas as cabeças se encontram paralelamente ao solo. Nas serpentes mambas, a parte anterior do tronco é entrelaçada e longe do solo, as cabeças estão na posição vertical e as caudas podem ser encontradas entrelaçadas ou livres. Para as peçonhentas, os viperídeos e os crotalídeos, o tronco é pouco entrelaçado e pouco elevado, com cabeças em posição vertical, de orientação face a face ou na mesma direção. Para as salamantas ou jiboia arco-íris (*Epicrates crassus*), um terço do seu corpo encontra-se elevado, permanecendo entrelaçadas no chão e constringindo fortemente uma à outra (Figura 8) (PIZZATO, ALMEIDA-SANTOS, MARQUES, 2006).

Figura 8: Posturas características durante o combate ritual. Família Colubridae – *Drymarchon corais* (A); Família Elapidae - *Micrurus frontalis* (B); Família Elapidae - *Bungarus fasciatus* (C); Família Elapidae - *Ophiophagus hannah* (D); Família Viperidae - *Crotalus durissus* (E); Família Colubridae - *Chironius bicarinatus* (F).



Fonte: ZACARIOTTI, 2004.

2.4.6 Corte e cópula

Durante a estação reprodutiva, os machos tendem a procurar as fêmeas através de feromônios deixados por ela no ambiente, justamente, por serem animais de hábitos solitários (ZACARIOTTI, GUIMARÃES, 2010).

A corte é dividida em três etapas, a primeira caracterizada pela perseguição tátil, onde o macho reconhece e localiza as fêmeas através de pistas químicas. Na segunda fase, ocorre o alinhamento do macho sobre o dorso da fêmea (Figura 9), nas *Pythonidae* os machos podem morder o corpo da fêmea e nos *Boidae* as fêmeas são estimuladas por esporões. Já a terceira e última fase é a cópula, no qual ocorre o entrelaçamento das caudas e as fêmeas abrem a cloaca para a penetração do hemipênis (PIZZATO, ALMEIDA-SANTOS, MARQUES, 2006; ZACARIOTTI, GUIMARÃES, 2010).

Figura 9: Alinhamento do macho sobre o dorso da fêmea, *Crotallus durissus terrificus*.



Fonte: Imagem de domínio público.

Uma estratégia das serpentes, para que ocorra a variabilidade genética, é a chamada cópula múltipla, onde as fêmeas se relacionam com diversos machos. No interior do sistema reprodutivo feminino ocorre a seleção dos melhores espermatozóides, de acordo com a maior qualidade seminal (PIZZATO, ALMEIDA-SANTOS, MARQUES, 2006).

2.4.7 Estocagem de espermatozóides

Algumas espécies de serpentes, tanto em machos quanto fêmeas, necessitam de estratégia para a estocagem de espermatozóides, ocorrendo variação de alguns meses a anos, principalmente porque a época de espermatogênese não coincide com a vitelogênese (ZACARIOTTI, 2008; BARROS, SUEIRO, ALMEIDA-SANTOS, 2012).

Nos machos o esperma é estocado na parte distal dos ductos deferentes e nas fêmeas o estoque ocorre no oviduto, pela formação de receptáculos ou túbulos de estocagem após a cópula ou em criptas em dobras da mucosa da vagina. Para garantir a sobrevivência dos espermatozóides por tanto tempo, novos estudos estão sendo realizados, mas há indícios que peptidases podem estar envolvidas. Esta habilidade ocorre principalmente para a sincronização de ciclos (ALMEIDA-SANTOS, 2005; BASSI, 2016).

Bassi (2016) concluiu em seu estudo que o SSR é rico em carboidratos neutros e porções de cadeias peptídicas, sendo assim, quando eles se juntam

com o sêmen servem como fonte de energia para sobrevivência e manutenção dos espermatozoides, principalmente quando estocados no oviduto da fêmea.

2.5 Biotecnologia da reprodução

As biotecnologias da reprodução são técnicas e tecnologias empregadas para a melhoria dos processos de reprodução dos seres vivos, garantindo até mesmo a conservação da biodiversidade. Vários tipos são descritos em literatura, como a fertilização *in vitro*, a clonagem, o transplante de embriões, engenharia genética com transferência ou edição de genes, além da criopreservação do material reprodutivo (RODRIGUES, BERTOLINI, 2019).

A criopreservação consiste no processo de congelamento e armazenamento de óvulos, espermatozoides e embriões, para o uso futuro. Essa técnica é utilizada para animais que tem algum problema anatômico/fisiológico, que impossibilita a cópula, animais que estão em tratamento médico, como no caso de quimioterápicos que podem afetar a capacidade reprodutiva (BARBOSA, *et al*, 2023).

As aplicações são na conservação de espécies ameaçadas de extinção, produção em massa de veneno e no estudo da biologia reprodutiva das mesmas. Para a conservação a inseminação artificial é utilizada para melhorar a reprodução das serpentes ameaçadas, para aumentar a sua sobrevivência e proteger da extinção (BRAGA, 2016).

O estudo da biologia reprodutiva das serpentes ajuda no melhor entendimento das suas características reprodutivas e fisiologia reprodutiva no geral, o que pode ser de grande utilidade para a conservação e preservação desses animais (ZACARIOTTI, GUIMARÃES, 2010).

Entretanto, a área de biotecnologia da reprodução em serpentes é relativamente nova e necessita de novos estudos para desenvolver técnicas eficazes e seguras para a aplicação em larga escala. As biotecnologias da reprodução em serpentes é uma área de pesquisa que busca desenvolver técnicas para manipular a reprodução de serpentes em cativeiro. Incluindo técnicas como inseminação artificial, fertilização *in vitro* e clonagem. Ademais, para o desenvolvimento dessas técnicas as questões éticas e de bem-estar precisam ser consideradas (BRAGA, 2016).

2.5.1 Exame andrológico

O exame andrológico reflete condições reprodutivas do macho, na maioria das vezes realizado antes da estação reprodutiva, a fim de identificar casos de sub ou infertilidade (DINIZ, *et al*, 2021).

A observação da condição semiológica, bem como as alterações genéticas, saúde do animal, deficiências na cópula, seja ela por alterações locomotoras ou alterações do sistema genital e/ou problemas espermáticos, fazem parte a avaliação andrológica (PAPA *et al.*, 2014; DINIZ, *et al*, 2021).

2.5.1.1 Avaliação espermática

A avaliação espermática é empregada para avaliar a qualidade e a quantidade dos espermatozoides encontrados em uma amostra de sêmen. Sendo fundamental para a identificação de problemas de fertilidade dos machos e para as técnicas de reprodução assistida (MACÊDO, *et al*, 2021).

Normalmente, a avaliação espermática é realizada por meio de análise microscópica de uma amostra de sêmen coletada (PAPA *et al.*, 2014).

Os principais parâmetros avaliados incluem o volume do ejaculado, concentração, motilidade, morfologia e vitalidade dos espermatozoides (MACÊDO, *et al*, 2021; PAPA *et al.*, 2014).

2.5.1.1.1 Volume, cor, densidade e odor do ejaculado

O volume do ejaculado é caracterizado pela quantidade de sêmen presente em uma ejaculação. De avaliação macroscópica, com o auxílio de uma pipeta e/ou tubos com medidas. Para animais domésticos o seu volume varia de 20 a 100 mls, enquanto para animais silvestres o volume pode variar conforme a classe e a espécie que o animal pertence (BABAKHANZADEH, NAZARI, GHASEMIFAR, KHODADADIAN, 2020; ABIOJA, *et al*, 2021).

No caso da coloração do ejaculado a mesma sofre variação, caracterizada desde branco acinzentado até um branco leitoso, já no caso da densidade a mesma está relacionada diretamente com a concentração espermática, sofrendo também variação que do tipo aquoso até o leitoso, com odor “sui-generis” (PAPA *et al.*, 2014).

2.5.1.1.2 Concentração e motilidade dos espermatozóides

A concentração dos espermatozóides é a quantidade de espermatozóides presentes em um mililitro de sêmen. Já a motilidade é a capacidade dos espermatozóides de se movimentarem de forma sincronizada, é avaliada em termos de porcentagem de espermatozóides em movimento e a qualidade do movimento. Essa escala de porcentagem varia de 0 a 100%. Caso a amostra apresente uma alta concentração de espermatozóides deve-se realizar uma pré-diluição (BISWAS, MOHAN, SASTRY, 2009).

Para a avaliação, se faz necessário a utilização de microscopia óptica, com o aumento de 200 vezes. O material é depositado entre uma lâmina e lamínula, e realizada a observação. Para animais domésticos é necessário aquecer o material a temperatura de 37°C, no caso dos répteis não é necessário o aquecimento devido a sua característica de animais pecilotérmicos ou ectotérmicos, ou seja, sua temperatura corporal varia conforme a temperatura ambiental. Mas para animais silvestres poucas identificações são encontradas na literatura, assim há a necessidade de novos estudos (BRAGA, 2016).

2.5.1.1.3 Morfologia, vitalidade e vigor dos espermatozóides

A morfologia refere-se à forma e a estrutura dos espermatozóides. Um alto percentual de espermatozóides como morfologia anormal pode mostrar problemas de infertilidade (MACÊDO, *et al*, 2021; ABIOJA, *et al*, 2021).

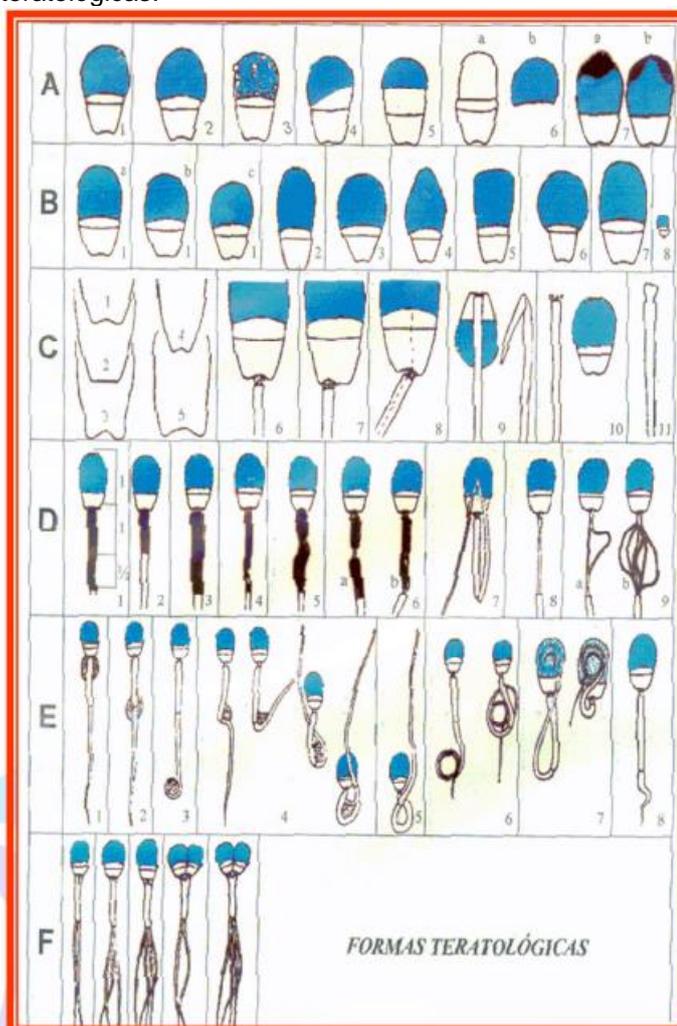
A avaliação da vitalidade e vigor espermático deve ocorrer concomitantemente com a motilidade espermática. A vitalidade refere-se a proporção de espermatozóides vivos em uma amostra de sêmen, já o vigor é a velocidade com que os espermatozóides se deslocam na lâmina, o mesmo é descrito em escala de 0 a 5 (PAPA *et al.*, 2014).

2.5.1.1.4 Patologias espermáticas

O objetivo das biotecnologias da reprodução é aumentar a propagação do material genético em um menor espaço de tempo, com isso, a manipulação dos gametas e a sua criopreservação compromete a sua função biológica, por ocasionar danos a sua estrutura espermática (SILVA, GUERRA, 2011).

Com isso, na literatura são descritos dois padrões de injúrias espermáticas, os defeitos maiores, relacionados diretamente com a infertilidade e os defeitos menores, que não são relacionados a fertilidade (PAPA, *et al*, 2014). As principais patologias espermáticas estão relacionadas à cabeça, colo, peça intermediária, cauda e outras anormalidade como aglutinação de cabeça, espermatozóides subdesenvolvidos, medusa e pseudogota (ARRUDA, *et al*, 2015).

Figura 10: Elementos figurados do sêmen. A – Patologias de acrossomo. B – Patologias de cabeça. C- Patologias de inserção de cauda. D – Patologia de peça intermediária. E – Patologias de cauda. F – Formas teratológicas.



Fonte: PAPA, *et al*, 2014.

2.6 Biotecnologia da reprodução em Serpentes

2.6.1 Colheita de sêmen

A primeira colheita de sêmen descrita em literatura ocorreu no ano de 1960 por Zacariotti e Guimarães (2010). A técnica consistiu na compressão do terço final do corpo do animal, mas no caso ocorreu a contaminação das amostras por fezes e urato. Em 1980, a técnica de colheita de sêmen foi através de massagem ventral no terço final do corpo do animal, o ejaculado foi coletado com o auxílio de seringa diretamente na cloaca, para minimizar a contaminação anteriormente descrita (Figura 10 e 11) (ZACARIOTTI, GUIMARÃES, 2010).

Figura 11: Massagem ventral para colheita de sêmen em cascavel (*Crotalus durissus terrificus*). A seta indica o sentido da massagem.



Fonte: ZACARIOTTI, 2004.

Figura 12: Colheita de sêmen em cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) a partir da papila genital localizada na cloaca.



Fonte: ZACARIOTTI, 2004.

No ano de 1989 a colheita de sêmen ocorreu com o auxílio de eletroejaculador, com posterior massagem digital em região ventral, mas assim como a primeira técnica descrita, ocorreu a contaminação com fezes e urato. O método mais invasivo descrito na literatura é através da retirada dos ductos deferentes e posterior coleta do sêmen, todo o experimento ocorre após a eutanásia do animal (FAHRIG, MITCHELL, EILTS, PACCAMONTI, 2007; ZACARIOTTI, GUIMARÃES, 2010; MOZAFARI, SHIRAVI, TODEHDEGHAN, 2012; SILVA, 2017).

Zacariotti (2004) realizou uma mudança nas técnicas descritas em literatura e aplicou solução anestésica de lidocaína a 1% na dose de 15 mg/kg, sendo que a mesma foi diluída para um volume total de 1 mL de solução fisiológica. Após isso, a solução foi fracionada em quatro locais de injeção anterior à cloaca e foi aplicada no tecido subcutâneo, com isso houve o relaxamento e o acesso direto a papila genital para a coleta com o auxílio de uma seringa de 1 mL sem agulha. A espécie utilizada nesse estudo foi a *Crotalus durissus terrificus*. Com a eficácia da utilização do anestésico local, estudos com outras espécies foram descritos, como é o caso de Silva (2014),

que realizou a avaliação do espermograma em jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*) e em coral (*Micrurus corallinus*) por Silva (2017).

2.6.2 Avaliação macroscópica e microscópica

Para o conhecimento dos parâmetros normais da espécie e avaliação do potencial reprodutivo do macho é necessário a realização do espermograma, mas ainda há pouco relatos em serpentes (ZACARIOTTI, GUIMARÃES, 2010).

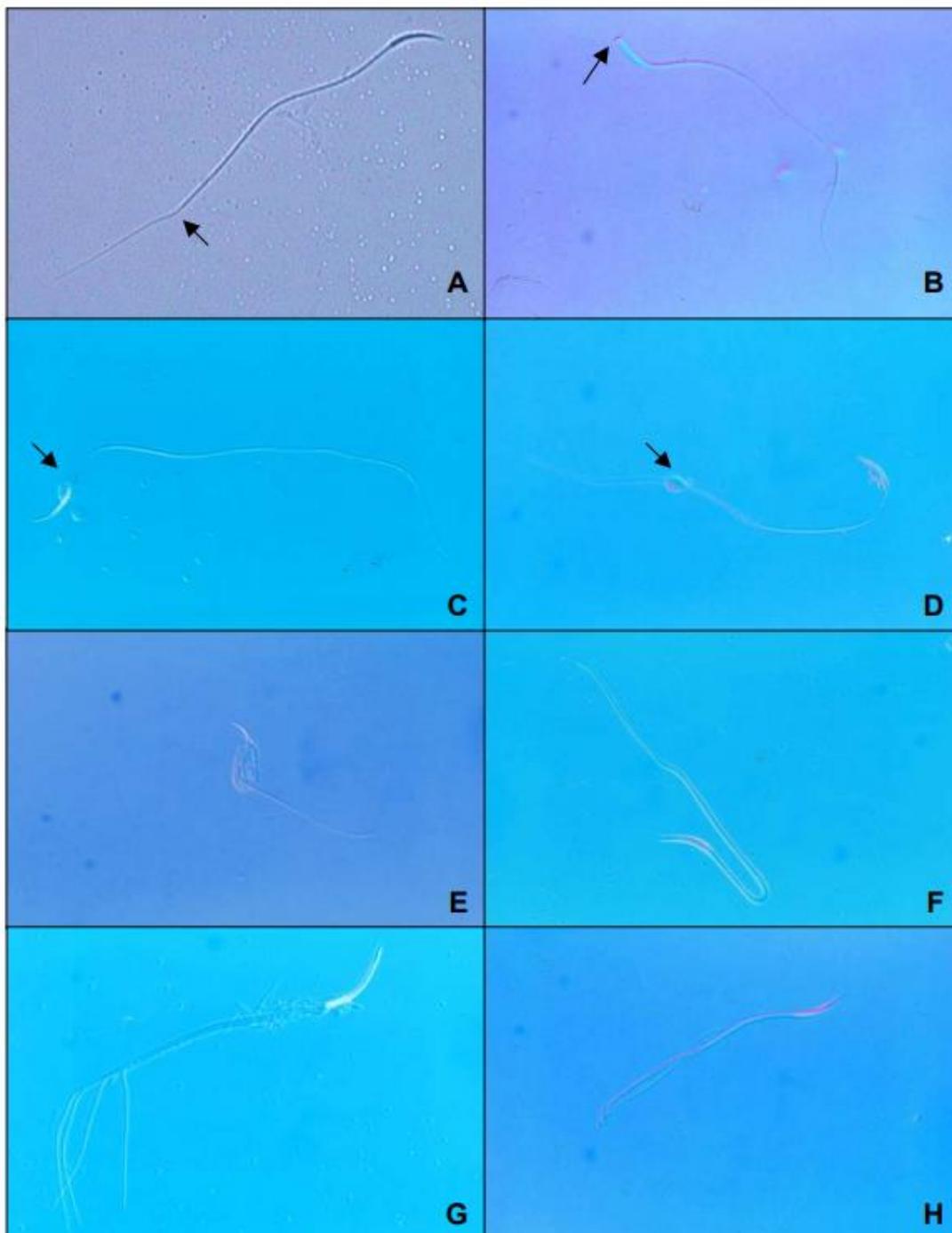
Como o sêmen de serpentes é altamente concentrado, indica-se a realização de uma pré-diluição para a posterior análise, sendo que estas diluições podem ser ao redor de 1:500 como descrito por Zacariotti (2008) ou 1:1000 como exposto no estudo de Silva (2014). Para a diluição, os meios de cultivos de células são os mais indicados, como o M199, Ham's F10, PBS e a solução de TL Hepes. Como as serpentes são animais ectodérmicos, não há a necessidade do uso de placas aquecedoras, a temperatura ideal pra eles é entre 25 a 27°C (ZACARIOTTI, GUIMARÃES, 2010).

A análise macroscópica do sêmen é realizada de acordo com o volume, densidade, cor e odor, já a microscópica, de acordo com o turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração dos espermatozóides e patologias espermáticas. Também ocorre a divisão quanto a exames imediatos (realizados logo após a colheita) e mediatos (são realizados após a colheita, mas analisados posteriormente), assim os imediatos são volume, cor, densidade, odor, motilidade e vigor espermático, e os mediatos são concentração e patologias espermáticas (Figura 12) (PAPA *et al.*, 2014).

Para as serpentes são descritas por Almeida - Santos (2014) e Zacariotti (2004) as seguintes características:

- Volume: 0,5 a 10 µL (estimado em micropipeta);
- Aspecto: Aquoso a leitoso;
- Cor: Branco acinzentado a leitoso;
- Odor: "*suis generis*";
- Turbilhonamento: 0 a 5;
- Motilidade: 50 a 70%;
- Vigor: 4 a 5;

Figura 13: Espermatozóide de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) sob microscopia de luz com interferência de fase (Olympus BX 50) e aumento da objetiva de 100 vezes. A – Espermatozóide normal. A seta aponta o fim da peça intermediária. (As setas nas fotos a seguir apontam as alterações morfológicas descritas) B – Acrossoma dobrado. C – Gota citoplasmática proximal. D – Gota citoplasmática distal. E – Peça intermediária enrolada. F – Peça intermediária dobrada. G – Forma teratológica. H – Cauda fortemente dobrada.



Fonte: ZACARIOTTI, 2004.

2.6.3 Criopreservação

A criopreservação de sêmen de serpentes ainda é pouco estudada, com isso poucas técnicas são descritas na literatura. Os diluidores mais utilizados são a base de leite, água de coco, Ham's F10 e test-gema (FAHRIG, MITCHELL, EILTS, PACCAMONTI, 2007; ZACARIOTTI, 2008; SALVADOR, TRILLO, MARCORRO, 2016). Alguns autores relataram que o glicerol é tóxico para o espermatozóide da espécie em questão, mas o estudo de Zacariotti (2008) provou o contrário, pois conseguiu manter a motilidade de 70% imediatamente após a descongelação, utilizando como diluidor o test-gema e 8% de glicerol.

Desde 1980 são descritas técnicas para a criopreservação de sêmen e com o passar dos anos as técnicas são modificadas e melhoradas. Nos primeiros estudos, utilizou como diluidor para a refrigeração o meio de cultura celular modificado de McCoy e manteve a motilidade espermática da amostra viável até 96 horas após o procedimento, o mesmo autor ainda realizou a congelação dos espermatozoides com um diluidor comercial e obteve 30 % de motilidade após a descongelação (SILVA, BATISTA, COLETO, GUERRA, 2009; ZACARIOTTI, GUIMARÃES, 2010).

Fahrig *et al.* (2007) em seu experimento conseguiu deixar o sêmen de snake (*Pantherophis guttatus*) com motilidade espermática maior que 50% durante 48 horas, para tal utilizou test-gema e resfriou a amostra até 4°C. No mesmo ano, Mattson *et al.* em seu estudo, utilizou a mesma espécie, mas com protocolo diferente, neste o sêmen foi diluído em solução de TL herpes para a avaliação da concentração espermática e conseguiu manter a motilidade entre 70 a 95% por três dias a uma temperatura de refrigeração de 4 a 10°C.

Zacariotti (2008) em seu experimento utilizou como diluidores o test-gema e diluidor Lake's, no estudo 4 diferentes protocolos para a congelação foram testados, sendo que o primeiro era em *pellet* (gotejamento da amostra em nitrogênio líquido), o segundo consistia em uma recipiente específico para a congelação, o 5100 Cryo 1º, sendo que primeiramente foi resfriado a 4°C, depois até -80°C e por fim mantido em nitrogênio líquido por -196°C e no protocolo três e quatro as amostras foram colocadas na máquina para congelação com dois protocolos diferentes, que após estabilizarem a 4°C, elas

foram congeladas. Para a descongelação empregou três protocolos diferentes com 10 minutos de espera.

2.6.4 Inseminação artificial

Para a inseminação artificial de serpentes, as técnicas desenvolvidas utilizam sêmen fresco ou refrigerado, sendo que não há relatos com sêmen congelado. O sêmen é depositado nos ovidutos das fêmeas, sendo a localização desse órgão na cloaca muito importante. Para isso utilizam sondas, podendo ser flexível ou rígida, com tamanho ideal para a fêmea, no final da sonda acopla-se uma seringa com o sêmen. O momento da deposição do sêmen ainda não está bem descrito, mas alguns autores utilizaram o período natural da cópula do animal (ZACARIOTTI, 2008; ZACARIOTTI, GUIMARÃES, 2010).

Mesmo nos estudos que obtiveram êxito na inseminação, o número de filhotes foi reduzido quando comparado com a cópula natural. A reprodução desses animais é dificultada principalmente pela falta de literaturas a respeito da fisiologia dos répteis (ZACARIOTTI, 2008; ZACARIOTTI, GUIMARÃES, 2010).

3. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

3.1 Objetivo geral

Realizar a colheita de sêmen em serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus* pelo método não invasivo, descrito por Mengden (1980).

3.2 Objetivos específicos

Avaliar as características macroscópicas, como volume, cor e odor, e microscópicas, como vigor, motilidade espermática, motilidade progressiva espermática, presença de patologias espermáticas e concentração espermática, de serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aprovação do Comitê de Ética de Uso Animal – CEUA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade de Marília – UNIMAR, conforme as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), de acordo com os preceitos da lei nº 11794 de 8 de agosto de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, através do certificado identificado como CIAEP-01.0218.2014 e sob o protocolo 24/2022 (Anexo 1).

4.2 Animais

Foram selecionadas cinco serpentes machos, da espécie *Crotallus durissus terrificus*, nome popular cascavel. Todos os animais são pertencente a APASS - Associação Protetora de Animais Silvestres, situado na cidade de Assis - São Paulo.

Para cada animal foi confeccionada uma ficha de avaliação geral contendo a idade do animal, dados sobre a alimentação, a estrutura do recinto e o comprimento rostro cloacal e ainda, em outra ficha específica para cada animal foi anotado dados referentes ao exame clínico, contendo o comportamento, o estado nutricional, a ingestão de água, a ingestão de alimentos, o peso, nível de hidratação, aspecto da pele e anexos, dados sobre a palpação, o tônus muscular, a micção e defecação.

4.3 Colheita de sêmen

O sêmen foi colhido através da metodologia descrita por Mengden *et al.* (1980), na qual foi realizada a massagem digital na região ventral do terço final do animal e com o auxílio de uma seringa de 1mL, o sêmen foi colhido diretamente na cloaca, para evitar a contaminação do material biológico com fezes e urina que podiam estar presentes no local.

Primeiramente, para a colheita o animal foi contido fisicamente em tubo plástico e posicionados em decúbito dorsal. Com isso, iniciaram-se as massagens ventrais e essas foram realizadas durante 20 minutos, para que o sêmen fosse ejetado, após isso, o mesmo foi colhido com uma seringa de 1

mL, e então colocado em uma lâmina de vidro e sobreposto uma lamínula, para a avaliação em microscopia óptica com aumento de 40x.

4.4 Avaliação seminal

A avaliação seminal foi realizada através de espermograma, ou mais conhecido na área de medicina veterinária como exame andrológico, que dispõe dos métodos macroscópico e microscópico de análise. Não foi necessária a utilização de placa aquecedora na realização desta avaliação seminal, como em outras espécies animais, já que como conhecido anteriormente, as serpentes são animais ectodérmicos, sendo a temperatura ideal para elas entre 25 e 27°C.

As amostras seminais foram inicialmente pré-diluídas em meio de cultivo PBS para sua melhor avaliação, já que o sêmen de serpentes é altamente concentrado. A diluição escolhida foi a de 1:500, conforme descrito na literatura por Zacariotti (2008).

A análise macroscópica do sêmen se fez através do volume, cor e odor seminal, já a microscópica, de acordo com a motilidade espermática, motilidade progressiva espermática, vigor, concentração dos espermatozóides e presença de patologias espermáticas.

Assim como nas avaliações seminais em outras diversas espécies, também foi realizada a análise das amostras imediata (realizada logo após a colheita) e mediata (não realizada após a colheita, mas analisada posteriormente), assim a análise imediata foi mensurada pelo volume, cor, odor, motilidade e vigor espermático, e a análise mediata pela concentração e presença de patologias espermáticas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos, mediante a colheita das amostras seminais das cascavéis *Crotallus durissus terrificus*, estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Valores obtidos após realização das avaliações seminais de todos os animais, quanto ao volume, cor e odor de sêmen, vigor, concentração espermática, motilidade espermática, motilidade espermática progressiva e presença de patologias espermáticas.

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5
Volume em uL (estimado com micropipeta)	10	9	11	10	10
Cor	Branco acinzentado	Branco acinzentado a leitoso	Branco acinzentado	Branco acinzentado a leitoso	Branco acinzentado a leitoso
Odor	" <i>suis generis</i> "	" <i>suis generis</i> "	" <i>suis generis</i> "	" <i>suis generis</i> "	" <i>suis generis</i> "
Vigor (escala de 1 a 5)	5	4	5	5	5
Concentração em espermatozoides/mL	$1,4 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$
Motilidade em %	70	68	65	68	70
Motilidade progressiva (escala de 1 a 4)	3	3	3	3	3
Presença de patologias espermáticas (escala de 1 a 4)	1	1	1	1	1

uL: microlitro; mL: mililitro; %: porcentagem

A média dos valores encontrada entre todas as amostras analisadas foi um volume de 10 uL estimado com micropipeta, coloração de branco acinzentado a leitoso, odor "*suis generis*", vigor de 4 a 5, conforme escala de 1 a 5, motilidade espermática de 68,2%, motilidade progressiva de 3, conforme escala de 1 a 4, presença de patologias espermáticas de 1, conforme escala de 1 a 4 e concentração espermática de $1,4 \times 10^9$ espermatozoides/mL.

Os valores encontrados no presente estudo são similares aos valores encontrados por Zacariotti (2004) e Almeida & Santos (2014) que descreveram a média das seguintes características: volume: 0,5 a 10 μ L (estimado em

micropipeta); aspecto: aquoso a leitoso; cor: branco acinzentado a leitoso; odor: “*suis generis*”; motilidade: 50 a 70% e Vigor: 4 a 5.

Além disso, para a realização do presente estudo, os animais foram contidos fisicamente através de tubos plásticos, técnica descrita para a contenção de serpentes peçonhentas, trazendo segurança para o animal e manipulador, corroborando com o que já foi descrito por Grego (2014).

O método de colheita de sêmen empregado no estudo em questão foi o de massagens abdominais ventrais, descrita por Mengden (1980), a técnica foi escolhida pela segurança e pouco desconforto que traz ao animal. Além disso, quando o ejaculado é coletado com o auxílio de uma seringa diminui o risco de contaminação com fezes e urato, como foi descrito por Mengden (1980), Zacariotti (2004 e 2007) e Silva (2014). Outras técnicas são descritas em literatura como a compressão do terço final do corpo do animal e a utilização do eletroejaculador, mas com comum contaminação da amostra (FITCH, 1960 E QUINN, 1989).

De modo geral as colheitas de sêmen para as serpentes peçonhentas são realizadas com maior facilidade quando comparada com as serpentes constritoras, como descrita no estudo de Oliveira (2018). As serpentes constritoras apresentam diferenças morfológicas, apresentando maior número de vértebras, que lhe conferem maior flexibilidade, possuem ainda maior número de segmentos de músculos axiais curtos, capazes de produzir maior força de contração (JAYNE, 1982).

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que a colheita de sêmen por método não invasivo, como proposto por Mengdel (1980), ainda se mostra possível de ser realizada para as serpentes da espécie *Crotallus durissus terrificus*. Além disso, os valores encontrados nesse estudo quanto ao volume, cor, odor, vigor, motilidade, motilidade progressiva e concentração espermática são semelhantes aos já descritos em literatura obtidos por metodologias invasivas, fortalecendo a eficiência da aplicação do método não invasivo de colheita seminal.

REFERÊNCIAS

ABIOJA, M. O. *et al.* Semen quality and sperm characteristics in broiler breeder cockerels fed vitamin E during hot season. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 45, 2021, p. 1 – 9.

ALMEIDA-SANTOS, Selma Maria. **Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de espermatozoides em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. 2005. 206 f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ALMEIDA-SANTOS, Selma Maria; BRAZ, Henrique Barbosa; SANTOS, Livia Cristina; SUEIRO, Letícia Ruiz; BARROS, Verônica Alberto; ROJAS, Claudio Augusto; KASPEROVICZUS, Karina Nunes. Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados. **Herpetologia Brasileira**, São Paulo, v. 3, n. 1, 2014, p. 14 – 24

ALMEIDA, F.S.; CONTE, A.V.; SANT'ANNA, S.S.; FERNANDES, W.; GREGO, K.F. Localização Topográfica e Imagem Ultrassonográfica dos Órgãos Internos da Jararaca (*Bothrops jararaca*, Serpentes, Viperidae). In: Congresso ABRAVAS. Campos do Jordão. **Anais do XIII Congresso ABRAVAS**, 2010, p. 67-70.

ANDRADE, A.; PINTO, SC.; OLIVEIRA, R.S. Animais de Laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. ISBN: 85-7541-015-6. Disponível em: <http://books.scielo.org>. Acesso em 05 de maio de 2023.

ARRUDA, R. P.; *et al.* Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, 2015, p. 47 – 60.

ASSIS, C.L.; *et al.* **Serpentes de Viçosa e região**. Viçosa: MZUFV, 2018.

BABAKHANZADEH, Emad; NAZARI, Majid; GHASEMIFAR, Sina; KHODADADIAN, Ali. Some of the Factors Involved in Male Infertility: a prospective review. **International Journal Of General Medicine**, v. 13, 2020, p. 29-41.

BARBOSA, L. P. *et al.* Renovação de diluidor na tecnologia de sêmen de pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 47, n. 2, 2023, p. 307 – 310.

BARROS, V.A.; SUEIRO, L.R.; ALMEIDA-SANTOS, S.M. Reproductive Biology of the Neotropical Rattlesnake *Crotalus durissus* from Northeastern Brazil: a Test of Phylogenetic Conservatism of Reproductive Patterns. **Herpetological journal**, São Paulo, v. 22, 2012, p. 97-104.

BASSI, Erick Augusto. **A Influências de Variações Climáticas no Ciclo Reprodutivo de Corais Verdadeiras *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis***. 2016. 111 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2016.

BERNARDE, P. S. **Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil**. São Paulo: Ed. Anolisbooks, 2014.

BISWAS, A., MOHAN, J., SASTRY, K. V. H. Effect of higher dietary vitamin E concentration on physical and biochemical characteristics of semen in Kadaknath cockerels. **British Poultry Science**, v. 50, n. 6, 2009, p. 733 – 738.

BRAGA, José Victor Cardoso. **Bioteχνologias da Reprodução e suas Aplicações na Conservação de Espécies: Uma Revisão**. 2016. 49 f. Dissertação (Bacharelado) – Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, 2016.

DINIZ, J. H. W. *et al.* The importance of updated criteria in breeding soundness examination of commercial Nellore bulls for the herd reproductive improvement. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, n.2, 2021, p. 285-292.

FAHRIG, B.M.; MITCHELL, M.A.; EILTS, B.E.; PACCAMONTI, D.L. Characterization and cooled storage of semen from corn snakes (*Elaphe guttata*). **J Zoo Wild Med**, Michigan, v.38, 2007, p.7-12.

FITCH, H.S. Criteria for determining sex and breeding maturity in snakes. **Herpetology**, v.16, 1960, p.49-51.

FRAGA, R.; LIMA, A. P.; PRUDENTE, A. L. C.; MAGNUSSON, W. E. **Guia de Cobras da Região de Manaus – Amazônia Central**. Manaus: Inpa, 2013.

FREITAS, D.C.; GOMES, W.P.B.; SILVA, R.C.C.; SEIBERT, C.S. Serpentes: é possível conviver com elas?. **Revista Brasileira de Ecoturismo**, São Paulo, v 13, n.3, 2020, pp. 572-586.

GREGO, K.F.; ALBUQUERQUE, L.R.; KOLESNIKOVAS, C.K.M. Squamata (Serpentes). In CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens**. São Paulo: Roca, 2014. p.186-218.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F. Variação Anual do Sistema Reprodutor de Fêmeas de *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). **Série Zoológica**, v. 94, n. 3, 2004, p. 325-328.

JAYNE, B.C. Comparative Morphology of the Semispinalis-Spinalis Muscles of Snakes and Correlations with Locomotion and Constriction. **Journal of Morphology**. 1982.

MACEDÔ, L. F. B. *et al.* Avaliação da viabilidade espermática de sêmen caprino criopreservado em meio ACP-101c e TRIS acrescido de gema de ovo de *Numida meleagris*. **Society and Development**, v. 10, n. 14, 2021, p. 1-16.

MATAYOSHI, Priscilla Mitie. **Caracterização Ultrassonográfica, Morfofisiológica do Sistema Reprodutor de Machos e Fêmeas de *Crotalus durissus terrificus***. 108 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

MATHIES, T. Reproductive Cycles of Tropical Snake. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. **Reproductive Biology and Phylogeny of Snake**. Enfield: Science Publishers, 2011. p. 511-550.

MELAZO, G. C. Percepção ambiental e Educação ambiental: Uma reflexão sobre as relações interpessoais e ambientais no espaço urbano. **Olhares e Trilhas**, Uberlândia, ano 6, n. 6, 2005, p. 45-51.

MENGDEN, A.G.; PLATZ, G.C.; HUBBARD, R.; QUINN, H. Semen collection, freezing and artificial insemination in snakes. In: Murphy JB. Reproductive biology and diseases of captive reptiles. Lawrence, KS: **The Society for the study of Amphibians and Reptiles**, 1980, p.71-78

MOZAFARI, S. Z.; SHIRAVI, A.; TODEHDEGHAN, F. Evaluation of Reproductive Parameters of Vas Deferens Sperms in Caucasian Snake (*Gloydius halys caucasicus*). **Veterinary Research Forum**, v. 3, n. 2, 2012, p. 119-123.

OLIVEIRA, S. L.; MANFIO, R. H.; COSTA, I. B. **Padronização da Colheita de Semên em Três Espécies de Serpentes: (*Epicrates crassus*, *Python regius* e *Crotalus durissus terrificus*)**. Londres: Novas Edições Acadêmicas, 2018.

PAPA, F.O. *et al.* **Manual de Andrologia e Manipulação de Sêmen Equino**. 2014.

PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; MARQUES, O. A. V. Biologia reprodutiva de serpentes brasileiras. **Herpetologia no Brasil**, v. 2, 2006, p. 202-221 (a).

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

PRADO, Ligia Pizzatto. **Ecomorfologia e Estratégias Reprodutivas nos Boidae (Serpentes), com Ênfase nas Espécies Neotropicais**. 162 f. Dissertação (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

QUINN, H.; BLASEDEL, T.; PLATZ, C.C. Successful artificial insemination in the checkered garter snake. **Int Zoo Yb**, v.28, 1989, p.177-183.

RODRIGUES, J. L.; BERTOLINI, B. Biotecnologias da reprodução animal: de Aristóteles à edição gênica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 2, 2019, p. 204 – 208.

SALOMÃO, M. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. The reproductive cycle in male neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). In: SCHUETT, G.W.; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. **Biology of the Vipers**. Indiana: Carmel, 2002, p.507-514.

SALVADOR, P. S.; TRILLO, A. Á.; MARCORRO, G. F. Choque Hipoosmótico en Espermatozoides de Víbora de Cascabel. **Revista Iberoamericana de Ciências**, v. 3, n. 3, 2016, p. 52-57.

SAWAYA, R. J.; MARQUES, O. A. V.; MARTINS, M. Composição e História Natural das Serpentes de Cerrado de Itirapina, São Paulo, Sudeste do Brasil. **Biota Neotropical**, v. 8, n. 2, 2008, p. 127-149.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, 2011, p. 370 – 384.

SILVA, S. V.; BATISTA, A. M.; COLETO, Z. F.; GUERRA, M. M. P. Diferentes métodos e técnicas na avaliação espermática: uma breve revisão. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 12, 2009, p. 1-15.

SILVA, Kalena Barros. **Avaliação do Espermograma de Jararaca-ilhoa, *Bothrops insularis*, (Serpentes: Viperidae) Mantidas em Cativeiro**. 53 f. 2014. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SILVA, K. B. *et al.* Coleta e avaliação do sêmen em cobra-coral *Micrurus corallinus* (Serpentes: Elapidae) In: Anais do Congresso Brasileiro de Herpetologia, 2017. **Anais eletrônicos**, Campinas, 2017.

SUEIRO, Leticia Ruiz. **Custos Reprodutivos em *Crotalus durissus* (Serpentes, Viperidae) do Estado de São Paulo, Brasil**. 2013. 102 f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ZACARIOTTI, Rogério Loesch. **Estudo longitudinal do espermograma e dos níveis de testosterona sérica de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*, Laurenti, 1768) proveniente da natureza do Estado de São Paulo**. 2004. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ZACARIOTTI, R.L.; DURRANT, B. The Bud Heller Conservation Fellowship for 2005: Assisted Reproduction in Snakes. **Conservation and Research for Endangered Species**, 2006.

ZACARIOTTI, R.L., GREGO, K.F., FERNANDES, W., SANT'ANNA, S.S. and GUIMARÃES, M.A.B.V. Semen collection and evaluation in free-ranging Brazilian rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*). **Zoo Biology**, vol. 26, no. 2, 2007, pp. 155-160.

ZACARIOTTI, Rogério Loesch. **Avaliação Reprodutiva e Congelação do sêmen de serpentes**. 2008. 98 f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ZACARIOTTI, R.L; GUIMARÃES, M.A.B.V. Aplicações da biotecnologia na reprodução de serpentes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte. v.34, n.2, 2010, p. 98 – 104.